

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 12 月 23 日 (23.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/111230 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, 1/21, C12P 17/18 //  
(C12N 1/21, C12R 1:465) (C12P 17/18, C12R 1:465)

(74) 代理人: 小林 和憲 (KOBAYASHI, Kazunori); 〒170-0004 東京都豊島区北大塚 2 丁目 2 番 1 号 太陽生命大塚ビル 3 階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007407

(22) 国際出願日: 2003 年 6 月 11 日 (11.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 社団法人北里研究所 (THE KITASATO INSTITUTE) [JP/JP]; 〒108-8642 東京都港区白金五丁目 9 番 1 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大村 智 (OMURA, Satoshi) [JP/JP]; 〒157-0076 東京都世田谷区岡本三丁目 3 番 1 2 号 Tokyo (JP). 池田 治生 (IKEDA, Haruo) [JP/JP]; 〒210-0900 神奈川県川崎市幸区新塚越 1-2 サウザンドシティ 5-1103 Kanagawa (JP). 小笠原 由美子 (OGASAWARA, Yumiko) [JP/JP]; 〒213-0033 神奈川県川崎市高津区下作延 1 8 7 7 番地 ヒルズ M 102 Kanagawa (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: STRAIN BELONGING TO THE GENUS STREPTOMYCES AND BEING CAPABLE OF PRODUCING NEMADICTIN AND PROCESS FOR PRODUCING NEMADICTIN USING THE STRAIN

(54) 発明の名称: ストレプトマイセス属に属するネマデクテン生産能を有する菌株、該菌株を用いるネマデクテンの製造法

(57) Abstract: To obtain nemadictin as C-13 hydroxynemadictin to which a saccharide can add, a strain capable of producing C-13 hydroxynemadictin is constructed by modifying nemadictin aglycon biosynthesis genes. Further, a C-13 glycosynemadictin-producing strain is constructed by transferring aveBI-BVIII genes participating in the glycosylation of Avermectin and the biosynthesis of oleandrose. Thus, C-13 hydroxynemadectin and nemadictin glycosylated at the C-13 position can be efficiently obtained with the use of the producing strains constructed molecular genetic techniques and it is expected that the biological activities thereof can be thus improved.

(57) 要約: 本発明は、ネマデクテンを、糖が付加し得る C-13 ヒドロキシルネマデクテンとして得るためにネマデクテンアグリコン合成遺伝子群の改変を行い、C-13 ヒドロキシルネマデクテンを生産する生産株を作製する。更にまた、エバメクチンの配糖化およびオレアンドロス合成に関与する aveBI-BVIII 遺伝子群を導入して、C-13 グリコシルネマデクテン生産株を作製する。このように、分子遺伝学的手法によって作製した生産株により C-13 ヒドロキシルネマデクテン及び C-13 位が配糖化されたネマデクテンを効率的に取得することができ、その生物活性の改善が期待できる。

WO 2004/111230 A1

# 明細書

ストレプトマイセス属に属するネマデクチン生産能を有する菌株、  
 該菌株を用いるネマデクチンの製造法

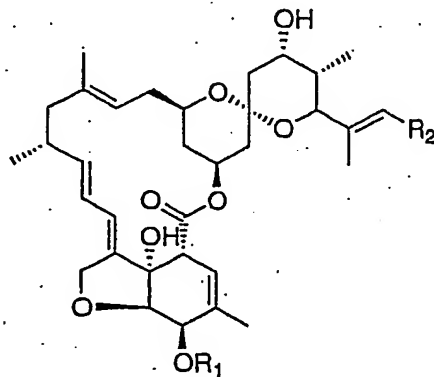
## 背景技術

### 産業上の利用分野

本発明はストレプトマイセス属に属するネマデクチン生産能を有する菌株、  
 該菌株を用いるネマデクチンの製造法に関し、更に詳しくはネマデクチン生産能  
 を有するストレプトマイセス属に属する微生物を用いるC-13ヒドロキシルネ  
 マデクチン及びC-13グリコシルネマデクチンの製造法及びストレプトマイセ  
 ス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属する菌株に  
 関する。

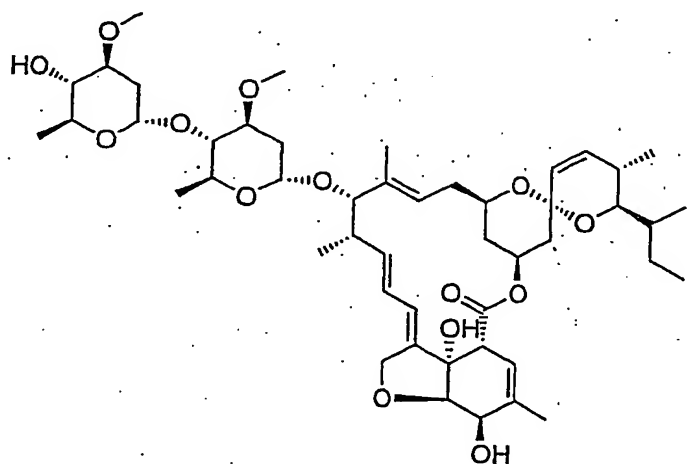
### 従来技術

ベンゾフラン環骨格を有する一連の化合物は優れた抗寄生虫・抗昆虫活性を  
 有し、エバーメクチンやミルベマイシンが実用化されている。ストレプトマイセ  
 ス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスが生産するベン  
 ゾフラン環骨格を有するネマデクチンは $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ および $\delta$ の4種の成分が存在  
 し、そのC-13位には下記の構造で表されるように置換基が存在せず飽和して  
 いる。



ネマデクチン $\alpha$	$R_1 = H$	$R_2 = CH(CH_3)_2$
$\beta$	$R_1 = H$	$R_2 = CH_3$
$\gamma$	$R_1 = CH_3$	$R_2 = CH_3$
$\delta$	$R_1 = CH_3$	$R_2 = CH(CH_3)_2$

ネマデクチンのC-13位が飽和する理由はネマデクチンアグリコン部分の生成に参与するネマデクチンポリケチド合成酵素（ネマデクチンPKS）のモジュール7がKS-AT-DH-ER-KR-ACPという構成をしている為めである。飽和したC-13位について化学合成的に立体選択的修飾をもたらすことは構造上困難であり、下記構造のエバーメクチンのように糖付加による抗昆虫・抗寄生虫活性の上昇への期待がもてるにもかかわらず、化学合成による誘導体の製造はなされていなかった。



上記のように、化学合成ではネマデクチンのC-13位に立体選択的に水酸基を導入することやその水酸基を配糖化することは困難とされていた構造を、本発明者らは、鋭意研究の結果、分子遺伝学的手法によってC-13グリコシルネマデクチン生産菌を作製することにより立体選択的に配糖化されたネマデクチンを効率的に取得することに成功した。

本発明はこのような知見に基いて完成されたものであり、その目的は分子遺伝学的手法によってC-13グリコシルネマデクチン生産菌を作製し、立体選択的に配糖化されたネマデクチンを効率的に取得することができ、その生物活性の改善を期待し得る、ストレプトマイセス属に属するネマデクチン生産能を有する

菌株を提供するものである。

本発明の他の目的は、ネマデクチンを生産するストレプトマイセス属に属する微生物に、ネマデクチン類似化合物を生産する微生物のDNAを導入してC-13ヒドロキシルネマデクチン及びC-13グリコシルネマデクチンを生産蓄積させ採取するネマデクチンの製造法を提供するものである。

### 発明の開示

本発明者らは、ネマデクチンを化学合成的に修飾可能な、特に糖が付加するC-13ヒドロキシルネマデクチンとして得るためにネマデクチンアグリコン生合成遺伝子群の改変を行い、ネマデクチンPKSとエバーメクチンポリケチド合成酵素（エバーメクチンPKS）とのハイブリッドポリケチド合成酵素（ハイブリッドPKS）を形成することによりC-13ヒドロキシルネマデクチンを生産する菌株を作製した。そして、エバーメクチンPKSの転写調節に関与するaveR遺伝子を導入してエバーメクチンPKS遺伝子の転写を促進させるとともにC-13ヒドロキシルネマデクチンの生産性を向上させた。

なお、本菌株は、ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus*)  $\Delta nemA.4::vph$   $\Delta attB_{Tet1}::aveA4-aveA3-aveE$   $\Delta attB_{\phi_{C31}}::aveR$  として、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）[AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan] の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (International Patent Organism Depositary National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) に寄託した。受託日は平成15年6月6日であり、受託番号はFERM BP-8395である。

さらにまた、エバーメクチンの配糖化及びオレアンドロース生合成に関与するaveB I-BVIII 遺伝子群を導入した菌株を作製し、C-13グリコシルネマデクチン生産株を作製した。

なお、本菌株は、ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus*)  $\Delta n e m A 4::v p h \quad a t t B_{T c 1}::a v e A 4-a v e A 3-a v e E \quad a t t B_{\phi c 3 1}::a v e R \quad a t t B_{R 4}::a v e B 1-B V I I I$  として、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) [AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan] の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (International Patent Organism Depositary National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) に寄託した。受託日は平成15年6月6日であり、受託番号はFERM BP-8394である。

本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属する菌株を培地で培養し、培養物中にC-13グリコシルネマデクチンを生産蓄積させ、該培養物よりC-13グリコシルネマデクチンを採取するC-13グリコシルネマデクチンの製造法である。また、本発明は、ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13ヒドロキシルネマデクチン及びC-13グリコシルネマデクチン生産能を有する菌株である。

以上のごとく、ネマデクチンを生産するストレプトマイセス属に属する微生物に、ネマデクチン類似化合物を生産する微生物のDNAを導入してC-13ヒドロキシルネマデクチン及びC-13グリコシルネマデクチンを生産蓄積せしめたという報告は未だ知られていない。

従って、本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシ

ーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する菌株を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する菌株を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する微生物を培地で培養し、培養物中にC-13位水酸化ネマデクチンを生産蓄積させ、該培養物よりC-13位水酸化ネマデクチンを採取するC-13位水酸化ネマデクチンの製造法を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する微生物を培地で培養し、培養物中にC-13位配糖化ネマデクチンを生産蓄積させ、該培養物よりC-13位配糖化ネマデクチンを採取するC-13位配糖化ネマデクチンの製造法を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群を保有するC-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する微生物及びその製造法を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群を保有するC-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する微生物及びその製造法を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ネマデクチンアグリコン生合成遺伝子群nemA3-4オペロンのKS10をコードする領域にバイオマイシン耐性遺伝子を挿入したネマデクチン非生産性の菌株(KS10挿入変位株)を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、上記KS10挿入変位株にストレプトマイセス・ア

ベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群 *aveA* 3-4 を保有し、*NemA* 1-2 及び *AVES* 3-4 とのハイブリッドPKSを形成しうる微生物を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、*NemA* 1-2 及び *AVES* 3-4 とのハイブリッドPKSを形成しうる微生物でストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチン生合成遺伝子群の制御遺伝子 *aveR* を保有する菌株を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、*NemA* 1-2 及び *AVES* 3-4 とのハイブリッドPKSを形成しうる微生物でストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチン生合成遺伝子群の制御遺伝子 *aveR* 及びエバーメクチン配糖化およびオレアンドロース生合成遺伝子群 *aveBI* - *BVIII* を保有する菌株を提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

第1図はネマデクチンPKSモジュール10のKS領域を含む3.0kb断片の制限酵素地図であり、矢印は転写方向を示す。

第2図はネマデクチンKS10領域のSalI部位vph挿入断片の制限酵素地図であり、矢印は転写方向を示す。

第3図はC-13ヒドロキシルネマデクチンの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルである。

第4図はC-13ヒドロキシルネマデクチンの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルである。

第5図はC-13グリコシルネマデクチンの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルである。

第6図はC-13グリコシルネマデクチンの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルである。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施例について具体的に説明するが、本発明は決してこれ

のみに限定されるものではない。

### 実施例 1

ネマデクチンPKS、KS10領域にバイオマイシン耐性遺伝子 (*viomycin phosphotransferase; vph*) を挿入したストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus sp. noncyanogenus*) NRRL 15773の取得

(1) ネマデクチンPKS、KS10をコードするDNA断片のサブクローニング

ネマデクチンアグリコン合成酵素遺伝子を含むコスミドDNAのうち、モジュール10のKSドメイン (NEM-KS10) をコードするDNAを含むコスミドDNAを制限酵素BamHI (宝酒造社製、日本国) で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、KS10領域を含有する3.0 kbのDNA断片をジーンクリーンIIキット (バイオ101社製、米国) を用いて分離・精製した。また、プラスミドpUC19 (宝酒造社製、日本国) は、BamHIで消化した後、alkaline phosphatase (Calf intestine) (宝酒造社製、日本国) で脱リン酸化した。NEM-KS10を含む3.0 kb断片とpUC19のBamHI消化物、各々約0.1  $\mu$ gをLigation High (東洋紡社製、日本国) を用いて、16°Cで16時間反応することで連結させた。

このDNA連結反応物10  $\mu$ lと大腸菌DH5 $\alpha$ のコンピテントセル (日本ジーン社製、日本国) を接触させることにより、形質転換を行った。形質転換株の選択には、50  $\mu$ g/mlのアンプシリン (和光純薬社製、日本国) を含有した20 mlのLB寒天培地を用い、0.1 mol/Lイソプロピルー $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 水溶液、2% 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルー $\beta$ -D-ガラクトシド (X-gal、ナカライテスク社製、日本国) のジメチルホルムアミド (ナカライテスク社製、日本国) 溶液を、あらかじめ各々50  $\mu$ l塗布しておいた。組換えプラスミドを保持する形質転換株のコロニ



ーは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を失っているため、X-galを分解できず、白色を呈する。この白コロニーをエーゼで拾い、1.0 mlのLB培地に植菌し、37°Cで16時間、振盪培養後、アルカリ法にて菌体からプラスミドを抽出・精製した。得られた組換えプラスミドの一部を制限酵素BamHIで消化し、3.0 kbのDNA断片がpUC19に挿入されているプラスミドpUC19::NEM-KS10が得られていることを確認した。

(2) ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* sp. noncyanogenus) NRRL 15773由来BamHI 3.0 kb DNA断片の末端配列の決定

はじめにサイクルシーケンス反応の鋳型DNAの調製を行なった。実施例1-(1)で得た組換えプラスミドpUC19::NEM-KS10に、ExpandTaqDNAポリメラーゼ緩衝液(Roch社製、米国)、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、配列番号1に記載の5'-GTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGG-3'の塩基配列を有する合成DNA、配列番号2に記載の5'-TCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA-3'の塩基配列を有する合成DNAをプライマーセットとして添加し、ExpandTaqDNAポリメラーゼ(Roch社製、米国)を加えた後、96°Cで5分間処理した後、96°Cで30秒間、70°Cで3分間の反応を1サイクルとして30サイクル繰り返した。反応終了後、エキソヌクレアーゼI(アマシャムファルマシアバイオテック社製、米国)及びアルカリフォスファターゼ(アマシャムファルマシアバイオテック社製、米国)を加え、37°Cで15分間反応させた後、80°Cで10分間処理して両酵素を失活させた。両酵素を失活させた後、これを鋳型DNAとしてIR標識プライマー(アロカ社製、日本国)及びThermo sequenase Fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP(アマシャムファルマシアバイオテック社製、米国)を添加し、サイクルシーケンス反応を行った。反応終了後、反応停止液を加え、混合し試料溶液とした。

この試料溶液を90℃、2分間加熱し、氷冷した後、シーケンス電気泳動を行った。電気泳動装置はDNAシーケンサーModel 4000シリーズ(LI-COR社製、米国)を使用し、電気泳動後のイメージの解析はBase Image IR Software Version 2.30のImage Analysis Version 2.10で行った。得られた各DNA断片の塩基配列をもとに、そのアミノ酸配列についてBLAST検索を行った結果、一端は*S. avermitilis* aveA4と相同性の高い配列、反対側の末端には*S. avermitilis*のreductaseと相同性の高い配列が見いだされた。これらの塩基配列から、BamHI断片のネマデグチンPKS遺伝子の転写方向を確認した(第1図参照)。

### (3) NEM-KS10領域へのバイオマイシン耐性遺伝子(viomycin phosphotransferase; vph)の挿入

pUC19::NEM-KS10を制限酵素BamHIで消化した後、アガロースゲル電気泳動し、KS10領域を含有する3.0kbのDNA断片を分離・精製した。また、pBluescript SK+ (東洋紡社製、日本国)をBamHIで消化して得た約3.0kbのDNA断片0.1μgとNEM-KS10を含むBamHI断片0.1μgを混合し、Ligation High (東洋紡社製、日本国)を用いて、16℃で16時間反応することで連結させた。このDNA連結反応物10μlと大腸菌DH5αのコンピテントセルを接触させることにより形質転換を行い、pBluescript SK+にNEM-KS10断片を連結した組換えプラスミドpBluescript SK+:NEM-KS10を得た。さらに、pBluescript SK+:NEM-KS10を制限酵素HindIII (宝酒造社製、日本国)及びSstI (GIBCO BRL社製、米国)で消化し、アガロースゲル電気泳動して得た約3.0kbのNEM-KS10を含有するDNA断片と、プラスミドpUC19をHindIII及びSstIで制限酵素消化した約2.7kbのDNA断片を各々0.1μgずつ混合し、Ligation Highを用いて、16℃で16時間反応することで連結させた。このDNA連結反応物10μlを用いて大腸菌DH5α

の形質転換を行い、pUC19-Bgl (pUC19のマルチクローニングサイトの両端EcoRIとHindIIIの外側にBglII切断配列AGATCTを挿入させたもの)にNEM-KS10断片を連結した組換えプラスミドpUC19-Bgl::NEM-KS10を得た。

vphはプラスミドpUC19::vphを制限酵素EcoRI (宝酒造社製、日本国)及びPstI (宝酒造社製、日本国)で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、vphを含む1.7kbのDNA断片を分離・精製することによって得た。このvphを含む1.7kbのEcoRI/PstI DNA断片はBKL kit (宝酒造社製、日本国)を用いて37℃で15分間反応することでDNA末端の平滑化を行った。pUC19-Bgl::NEM-KS10を制限酵素SalI (宝酒造社製、日本国)で消化した後、BKL kitを用いてSalI切断部位の平滑末端化を行った。平滑末端化した断片と上記の平滑末端化したvph 1.7kbのDNA断片と混合し、Ligation Highを用いてDNAの連結を行なった。このDNA連結反応物10 $\mu$ lを用いて大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換し、KS10領域内にvphを挿入した組換えプラスミドpUC19-Bgl::NEM-KS10-vphを得た (第2図参照)。なお、形質転換体の選択には50 $\mu$ g/mlのアンピシリン及び150 $\mu$ g/mlのツベラクチノマイシンN含有のLB培地を用いた。

pUC19-Bgl::NEM-KS10-vphを制限酵素BglII (宝酒造社製、日本国)で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、KS10-vph領域を含有する4.7kbのDNA断片を分離・精製した。放線菌用ベクタープラスミドpGM160を制限酵素BamHIで消化した後、アガロースゲル電気泳動し、6.8kbのDNA断片を分離・精製した。さらに、alkaline phosphatase (Calf intestine)を用いてDNA 5'末端の脱リン酸化を行った。このpGM160 BamHI消化物とNEM-KS10-vph領域を含有する4.7kbのDNA断片を各々0.1 $\mu$ gずつ混合し、Ligation Highを用いてDNAの連結を行った。このDNA連結反応物10 $\mu$ lを用いて大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換し、組換えプラスミドpGM160::NEM-KS10-vphを得た。なお、形質転換体の選択

には50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン及び150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のツベラクチノマイシンN含有のLB培地を用いた。pGM160::NEM-KS10-vphを用いて大腸菌GM2929 hsdS::Tn10の形質転換を行った。なお、形質転換体の選択には30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコール（和光純薬社製、日本国）、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン及び150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のツベラクチノマイシンN含有のLB培地を用いた。大腸菌GM2929 hsdS::Tn10の形質転換体から非メチル化プラスミドDNA pGM160::NEM-KS10-vphを調製した。

(4) ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* sp. noncyanogenus) NRRL 15773からのプロトプラストの調製

凍結(-30°C)保存してあるストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスの孢子懸濁液を50 mlの30%w/vシヨ糖、0.5%w/vグリシン、5mM  $\text{MgCl}_2$ を含むYEME培地(500 ml容三角フラスコ)に移植し、ロータリーシェーカーで30°C、48時間培養した。菌体を3000 rpm、10分間遠心して集め、20 mlのP10培地を加えてよく懸濁した後、3000 rpm、10分間遠心して菌体を洗浄した。洗浄した菌体に1 mg/mlの卵白リゾチーム含有のP10培地を加えて懸濁し、30°Cで30分間保温してプロトプラストを生じさせた。10 mlのP10培地を加えてよく混合した後、プロトプラスト懸濁液を綿栓フィルターに通しリゾチームで未消化の菌糸を除去した。綿栓フィルターを通過したプロトプラスト懸濁液を3000 rpm、10分間遠心し、プロトプラストを沈澱させた。上清を除き10 mlのP10培地でよく懸濁した後、3000 rpm、10分間遠心しプロトプラストを沈澱させた。再度P10培地を10 ml加え、プロトプラストを懸濁、遠心してプロトプラストを洗浄した。得られた洗浄プロトプラストを5 mlのP10培地に懸濁し、0.1 mlずつ滅菌したエッペンドルフチューブに分注した後、-80°Cで保存した。

(5) 染色体上のネマデクチンPKS、KS10領域にバイオマイシン耐性遺伝子(viomycin phosphotransferase; vph)を挿入した遺伝子交換体の作成

実施例1-(3)で得た組換えプラスミドpGM160::NEM-KS10-vph約1 $\mu$ gと実施例1-(4)で得たストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスのおよそ $5 \times 10^8$ 個のプロトプラストを滅菌したエッペンドルフチューブに入れ、直ちに5.00 $\mu$ lの25%ポリエチレングリコールMW1000溶液(2.5%ショ糖、0.05%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1M CaCl<sub>2</sub>、50mM Tris-マレイン酸、pH8.0)を加えて混合し、室温で1分間放置した。次に、450 $\mu$ lのP10培地を加えてよく混合した後、その100 $\mu$ lずつをR2YE寒天培地上にのせ、2.5mlの軟寒天培地とともに塗り広げた。30℃で20時間培養した後、200 $\mu$ g/mlのチオストレプトン(シグマ社製、米国)含有の軟寒天培地2.5mlを重ねた。30℃で5日間培養し、チオストレプトンに耐性な形質転換体を得た。

R2YE寒天培地表面に生育したチオストレプトンに耐性の形質転換体を無菌的にかきとり、ホモジナイザーで菌糸を切断し、YMS寒天培地に塗り広げた。37℃で4日間培養し、胞子が着生したものをマスタープレートとしてツベラクチノマイシンN含有YMS寒天培地にレプリカした。30℃で2日間培養し、ツベラクチノマイシンに耐性のコロニーを選択し、それぞれをYMS寒天培地上に塗布した。これを30℃で5日間培養して胞子が着生したものをマスタープレートとし、20 $\mu$ g/mlチオストレプトン含有YMS寒天培地にレプリカして30℃で2日間培養した。ツベラクチノマイシンに耐性、チオストレプトンに感受性となった株を選択し、染色体上のネマデクチンPKS、KS10領域にvphが挿入したことをSouthern hybridization法で確認するとともにネマデクチンを生産しないことを確認した。得られたそれぞれの菌株はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス $\Delta$ nemA4::vph株(*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus*  $\Delta$ nemA4::vp

h). とした。

なお、本菌株は、ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyanogriseus* subsp. *noncyanogenus*)  $\Delta n e m A 4::v p h$ として、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) [AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan] の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (International Patent Organism Depositary National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) に寄託した。受託日は平成15年6月6日であり、受託番号はFERM BP-8393である。

(6) ストレプトマイセス・エバーミチリス (*Streptomyces avermitilis*) 由来エバーメクチンアグリコン合成酵素遺伝子 *aveA3-4* の取得

ストレプトマイセス・エバーミチリスの染色体DNAを制限酵素 *EcoRI* で消化し、低融点アガロースゲル電気泳動した後、*aveA3-4* 全体を含有する配列番号3に記載の39912bpのDNA断片をゲルごと切り出し、フェノール抽出、フェノールクロロホルム抽出、アルコール沈澱することにより分離・精製した。また、染色体組込み型ベクタープラスミド *pTG1int-cos* を制限酵素 *EcoRI* で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、5.2kbのDNA断片を分離・精製した。この *EcoRI* 消化した *pTG1int-cos* を *alkaline phosphatase* (Calf intestine) を用いてDNA 5' 末端の脱リン酸化を行った後、約0.5  $\mu g$  を *aveA3-4* 全体を含有する39912bpのDNA断片約2  $\mu g$  と混合し、*Ligation kit ver. 2* (宝酒造社製、日本国) のI液およびII液を用いて、25°Cで10分間反応することで連結させた。

このDNA連結反応物をアルコール沈澱後、DNAを2  $\mu$  lのTE緩衝液に溶解した。これをReady To Go Lambda Packaging Kit（アマシャムファルマシアバイオテック社製、米国）のPackaging Extractに加え、さらに23  $\mu$  lの滅菌水を加え室温で2時間放置した後、0.5 mlのファージ希釈緩衝液（SM緩衝液）および30  $\mu$  lのクロロホルムを加え、転倒混和した。次いで、13200 rpmで30秒間遠心し、上清を新たな滅菌エッペンドルフチューブに移し、ラムダファージパッケージング溶液を得た。

#### （7）エバーメクチンアグリコン合成酵素遺伝子aveA3-4を保有する大腸菌BL21-recA欠損株の取得

実施例1-（6）で得たラムダファージパッケージング溶液を用いて大腸菌BL21-recA欠損株を宿主としてトランスダクションを行った。宿主大腸菌BL21-recA欠損株をLB培地を用いて、37℃、一晩振盪培養したものを0.4%麦芽糖添加LB培地に1%となるように加え、37℃、3時間振盪培養した。遠心分離により菌体を回収し、10 mM硫酸マグネシウム溶液を用いて洗浄した。さらに遠心分離により菌体を回収し、適量の10 mM硫酸マグネシウム溶液に懸濁して宿主菌液を得た。この宿主菌液と実施例1-（6）で得たラムダファージパッケージング溶液をエッペンドルフチューブ内で1：1の割合で混合し、室温で30分間静置した。その後、LB培地を加え、30℃で1.5時間振盪したものをカナマイシン（50  $\mu$  g/ml）含有LA培地上に塗布し、30℃で一晩培養した。カナマイシン耐性のコロニーを96穴テストプレートにライブラリーとして培養し、その中から配列番号4に記載の合成DNAとハイブリダイズするコスミドDNAを保有するクローンを選択した。エバーメクチンアグリコン合成酵素遺伝子aveA3-4を保有する組換えプラスミドDNAは、カナマイシン（50  $\mu$  g/ml）含有LB培地を用いて一晩培養した菌体から常法にしたがってアルカリ法で精製した。

#### 実施例2

ネマデクチンPKSモジュール10 v p h挿入変位株へのエバーメクチン生合成遺伝子群a v e A 3-4の導入

実施例1-(5)で得たネマデクチンPKSモジュール10領域v p h挿入株の孢子懸濁液を50 mlの30% w/v ショ糖、0.5% w/v グリシン、5 mM MgCl<sub>2</sub>を含むYEME培地(500 ml容三角フラスコ)に移植し、ロータリーシェーカーで30℃、48時間培養した。菌体を3000 rpm、10分間遠心して集め、20 mlのP10培地を加えよく懸濁した後、3000 rpm、10分間遠心して菌体を洗浄した。洗浄した菌体に1 mg/mlの卵白リゾチーム含有のP10培地を加えて懸濁し、30℃で30分間保温してプロトプラストを生じさせた。10 mlのP10培地を加えてよく混合した後、プロトプラスト懸濁液を綿栓フィルターに通しリゾチームで未消化の菌糸を除去した。綿栓フィルターを通過したプロトプラスト懸濁液を3000 rpm、10分間遠心し、プロトプラストを沈澱させた。上清を除き10 mlのP10培地でよく懸濁した後、3000 rpm、10分間遠心しプロトプラストを沈澱させた。再度P10培地を10 ml加え、プロトプラストを懸濁、遠心してプロトプラストを洗浄した。得られた洗浄プロトプラストを5 mlのP10培地に懸濁し、0.1 mlずつ滅菌したエッペンドルフチューブに分注した後、-80℃で保存した。

このプロトプラストに実施例1-(7)で作製したpTG1 int-cos::a v e A 3-4約1 μgを加え、直ちに500 μlの25%ポリエチレングリコールMW1000溶液(2.5% ショ糖、0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1 M CaCl<sub>2</sub>、50 mM Tris-マレイン酸、pH 8.0)を加えて混合し、室温で1分間放置した。次に、450 μlのP10培地を加えてよく混合した後、その100 μlずつをR2YE寒天培地上にのせ、2.5 mlの軟寒天培地とともに塗り広げた。30℃で20時間培養した後、100 μg/mlのネオマイシン(シグマ社製、米国)含有の軟寒天培地2.5 mlを重ねた。30℃で5日間培養し、ネオマイシンに耐性な形質転換体を得た。R2YE寒天培地表面に生育したネオマイシンに耐性の形質転換体を無菌的に2 μg/ml ネオマイシン含有YMS寒天培地に塗り広げた。得られたそれぞれの菌株はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスΔnemA



4 : : v p h a t t B<sub>reg1</sub> : : a v e A 4 - a v e A 3 - a v e E 株とした。

### 実施例 3

ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス  $\Delta n e m A 4 : : v p h a t t B_{reg1} : : a v e A 4 - a v e A 3 - a v e E$  株への *a v e R* の導入

配列番号 5 に記載のエバーメクチン生合成遺伝子群の転写制御遺伝子 *a v e R* を含む制限酵素 *A g e I* DNA断片を連結したベクタープラスミド *p U C B M 2 1 : : a v e R* を制限酵素 *X b a I* および *H i n d I I I* で消化し、アガロースゲル電気泳動し、*a v e R* を含有する 3. 2 7 k b の DNA断片を分離・精製した。染色体組込み型ベクタープラスミド *p U C 1 9 a a d 3" - i n t \Phi C 3 1* の *X b a I* および *H i n d I I I* 認識部位に *a v e R* 含有 3. 2 7 k b *X b a I - H i n d I I I* 断片を連結し、大腸菌 *B L 2 1 \Delta r e c A* を形質転換した。

実施例 2 で得たストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス  $\Delta n e m A 4 : : v p h a t t B_{reg1} : : a v e A 4 - a v e A 3 - a v e E$  株の孢子懸濁液を 5 0 m l の 3 0 % w / v ショ糖、0. 5 % w / v グリシン、5 m M *M g C l<sub>2</sub>* を含む Y E M E 培地 ( 5 0 0 m l 容三角フラスコ ) に移植し、ロータリシェーカーで 3 0 ° C 、 4 8 時間培養した。菌体を 3 0 0 0 r p m 、 1 0 分間遠心して集め、2 0 m l の P 1 0 培地を加えよく懸濁した後、3 0 0 0 r p m 、 1 0 分間遠心して菌体を洗浄した。洗浄した菌体に 1 m g / m l の卵白リゾチーム含有の P 1 0 培地を加えて懸濁し、3 0 ° C で 3 0 分間保温してプロトプラストを生じさせた。1 0 m l の P 1 0 培地を加えてよく混合した後、プロトプラスト懸濁液を綿栓フィルターに通しリゾチームで未消化の菌糸を除去した。綿栓フィルターを通過したプロトプラスト懸濁液を 3 0 0 0 . r p m 、 1 0 分間遠心し、プロトプラストを沈澱させた。上清を除き 1 0 m l の P 1 0 培地でよく懸濁した後、3 0 0 0 r p m 、 1 0 分間遠心しプロトプラストを沈澱させた。再度 P 1 0 培地を 1 0 m l 加え、プロトプラストを懸濁、遠心してプロトプラストを洗浄した。得られた洗浄プロトプラストを 5 m l の P 1 0 培地に懸濁し、0. 1 m l ずつ滅菌したエッペンドルフチューブに分注した後、- 8

0℃で保存した。このプロトプラストに上記で得たプラスミドDNA pUC19aad3"-intΦC31::aveR約1μgを加え、直ちに500μlの25%ポリエチレングリコールMW1000溶液(2.5%ショ糖、0.05%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1M CaCl<sub>2</sub>、50mM Tris-マレイン酸、pH8.0)を加えて混合し、室温で1分間放置した。

次に、450μlのP10培地を加えてよく混合した後、その100μlずつをR2YE寒天培地上にのせ、2.5mlの軟寒天培地とともに塗り広げた。30℃で20時間培養した後、スペクチノマイシン3mg/ml含有軟寒天培地2.5mlを重ねた。30℃で5日間培養しスペクチノマイシンに耐性な形質転換体を得た。R2YE寒天培地表面に生育したスペクチノマイシンに耐性の形質転換体を無菌的に300μg/mlスペクチノマイシン含有YMS寒天培地に塗り広げた。得られたそれぞれの菌株はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスΔnemA4::vph attB<sub>TC1</sub>::aveA4-aveA3-aveE attB<sub>φc31</sub>::aveR株とした。

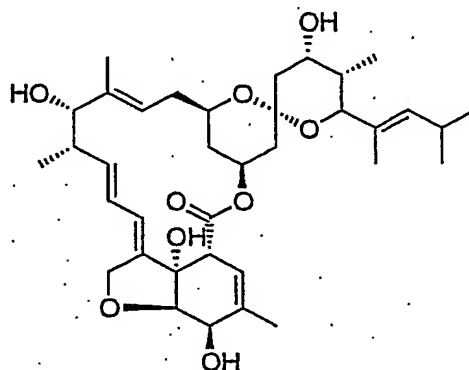
#### 実施例4

ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスΔnemA4::vph attB<sub>TC1</sub>::aveA4-aveA3-aveE attB<sub>φc31</sub>::aveR株の培養および生産物の分離・精製

実施例3で得た染色体上ネマデクチンPKSモジュール7vph挿入株にaveA3-4およびaveRを組み込んだ株をネマデクチン種培地に植菌し、30℃で3日間振盪培養したもの1mLを500mL容三角コルベンに分注したネマデクチン生産培地50mLに加えた。これを28℃で5日間、180rpmで振盪培養した後、3000rpmで10分間遠心し、菌体を回収した。得られた菌体をアセトンで懸濁し、室温で1時間攪拌した後、菌体とアセトン層を分取し、アセトン層について溶媒留去した。溶媒乾固した物質に水およびクロロホルムを加え攪拌した後、クロロホルム層を分取し、無水硫酸ナトリウムを加え脱水処理を行った。クロロホルム層の溶媒留去を行い、得られた残留物を粗抽出物とし

た。粗抽出物をごく少量のクロロホルムに溶解し、クロロホルムで平衡化したシリカゲル（シグマ社製、米国）カラムに通塔し、クロロホルムで洗浄した後、25% v/v 酢酸エチル/クロロホルムで洗浄し、C-13 ヒドロキシルネマデクチンを含まない画分を除去した。次いで、4.0% v/v 酢酸エチル/クロロホルムで溶出される画分を除去し、50% v/v 酢酸エチル/クロロホルムでC-13 ヒドロキシルネマデクチンを多く含む画分を集めた後、得られた溶出液を減圧乾固して黄色油状の物質を得た。次いで、得られた黄色油状の物質は以下の条件でHPLCを用いて分離・精製した。

Pegasil ODSカラム（ODS  $3\mu\text{m}$ 、カラムサイズ  $20\phi\text{mm} \times 250\text{mm}$ ；センシュ科学社製、日本国）を用い、アセトニトリル50%、メタノール18%、水32%の混合溶媒を移動相、検出246nm、流速8mL/minで分離した時、保持時間28分の成分を単離した。得られた化合物は、 $^1\text{H}$ -NMRスペクトル（第3図参照）データ、及び $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル（第4図参照）データおよびマスペクトルデータ（ $M+1=629$ ）によってその構造を解析し、下記式で表されるC-13 ヒドロキシルネマデクチン $\alpha$ （分子式： $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{O}_9$ ）であることを確認した。



#### 実施例 5

ストレプトマイセス・エバーミチリス (*Streptomyces averm*  
*itilis*) 由来エバーメクチン配糖化遺伝子群aveBI-BVIIIの取得  
配列番号6記載の11041bpのDNA断片、すなわちaveBI-BV  
III全体を含有するDNAを連結したpUC19::aveBI-BVIIIを制

制限酵素 *Xba*I および *Hind*III で消化し、*ave*B I-B VIII 全体を含有する DNA 断片を低融点アガロースゲル電気泳動した後、フェノール抽出、フェノールクロロホルム抽出、アルコール沈澱することにより分離・精製した。また、染色体組込み型ベクタープラスミド *pUC19intR4-ts r* を制限酵素 *Xba*I-*Hind*III で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、11 kb の DNA 断片を分離・精製した。これらの DNA 断片を *Ligation High* を用いて連結し、この DNA 連結反応物 10  $\mu$ l を用いて大腸菌 BL21  $\Delta$  *recA* を形質転換し、組換えプラスミド *pUC19intR4-ts r::ave* B I-B VIII を得た。なお、形質転換体の選択には 50  $\mu$ g/ml のアンピシリン含有の LB 培地を用いた。

#### 実施例 6

ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス  $\Delta$  *nemA4::vph attB<sub>intR4</sub>::aveA4-aveA3-aveE attB $\phi$ <sub>c31</sub>::aveR* 株へのストレプトマイセス・エバーミチリス (*Streptomyces avermitilis*) 由来エバーメクチン配糖化及びオレアンドロース生合成遺伝子群 *ave* B I-B VIII の導入

実施例 3 で得たストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス  $\Delta$  *nemA4::vph attB<sub>intR4</sub>::aveA4-aveA3-aveE attB $\phi$ <sub>c31</sub>::aveR* 株の胞子懸濁液を 50 ml の 30% w/v ショ糖、0.5% w/v グリシン、5 mM  $MgCl_2$  を含む YEME 培地 (500 ml 容三角フラスコ) に移植し、ロータリシェーカーで 30°C、48 時間培養した。菌体を 3000 rpm、10 分間遠心して集め、20 ml の P10 培地を加えよく懸濁した後、3000 rpm、10 分間遠心して菌体を洗浄した。洗浄した菌体に 1 mg/ml の卵白リゾチーム含有の P10 培地を加えて懸濁し、30°C で 30 分間保温してプロトプラストを生じさせた。10 ml の P10 培地を加えてよく混合した後、プロトプラスト懸濁液を綿栓フィルターに通しリゾチームで未消化の菌糸を除去した。綿栓フィルターを通過したプロトプラスト懸濁液を 3000 rpm、10 分間遠心し、プロトプラストを沈澱さ

せた。上清を除き10mlのP10培地でよく懸濁した後、3000rpm、10分間遠心しプロトプラストを沈澱させた。再度P10培地を10ml加え、プロトプラストを懸濁、遠心してプロトプラストを洗浄した。得られた洗浄プロトプラストを5mlのP10培地に懸濁し、0.1mlずつ滅菌したエペンドルフチューブに分注した後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。このプロトプラストに実施例5で得たプラスミドDNA pUC19intR4-tsrr::aveBI-BVII約 $1\mu\text{g}$ を加え、直ちに500 $\mu\text{l}$ の25%ポリエチレングリコールMW1000溶液(2.5%シヨ糖、0.05% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1M  $\text{CaCl}_2$ 、50mM Tris-マレイン酸、pH8.0)を加えて混合し、室温で1分間放置した。

次に、450 $\mu\text{l}$ のP10培地を加えてよく混合した後、その100 $\mu\text{l}$ ずつをR2YE寒天培地上にのせ、2.5mlの軟寒天培地とともに塗り広げた。 $30^{\circ}\text{C}$ で20時間培養した後、チオストレプトン200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有軟寒天培地2.5mlを重ねた。 $30^{\circ}\text{C}$ で5日間培養しチオストレプトンに耐性の形質転換体を得た。R2YE寒天培地表面に生育したチオストレプトンに耐性の形質転換体を無菌的に20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ チオストレプトン含有YMS寒天培地に塗り広げた。得られたそれぞれの菌株はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス $\Delta\text{nemA4}::\text{vph attB}_{\text{TG1}}::\text{aveA4-aveA3-aveE attB}_{\phi\text{c31}}::\text{aveR attB}_{\text{R4}}::\text{aveBI-BVIII}$ とした。

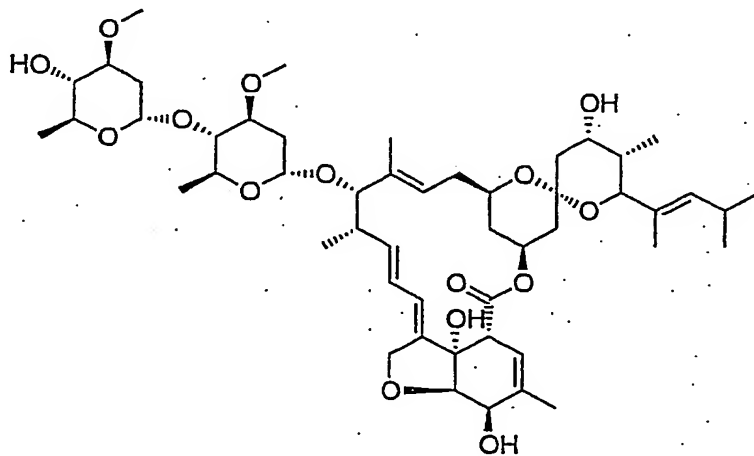
#### 実施例7

ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス $\Delta\text{nemA4}::\text{vph attB}_{\text{TG1}}::\text{aveA4-aveA3-aveE attB}_{\phi\text{c31}}::\text{aveR attB}_{\text{R4}}::\text{aveBI-BVIII}$ 株の培養および生産物の分離・精製

実施例6で得た染色体上ネマデクチンPKSモジュール10のvph挿入株にaveA3-4, aveRおよびaveBI-BVIIIを組み込んだ株をネマデクチン種培地に植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$ で3日間振盪培養したもの1mLを500mL

容三角コルベンに分注したネマデクチン生産培地 5.0 mL に加えた。これを 28 °C で 5 日間、180 rpm で振盪培養した後、3000 rpm で 10 分間遠心し、菌体を回収した。得られた菌体をアセトンで懸濁し、室温で 1 時間攪拌した後、菌体とアセトン層を分取し、アセトン層について溶媒留去した。溶媒乾固した物質に水およびクロロホルムを加え攪拌した後、クロロホルム層を分取し、無水硫酸ナトリウムを加え脱水処理を行った。クロロホルム層の溶媒留去を行い、得られた残留物を粗抽出物とした。粗抽出物をごく少量のクロロホルムに溶解し、クロロホルムで平衡化したシリカゲル（シグマ社製、米国）カラムに通塔し、クロロホルムで洗浄した後、30% v/v 酢酸エチル/クロロホルムで洗浄し、C-13 グリコシルネマデクチンを含まない画分を除去した。次いで、40% v/v 酢酸エチル/クロロホルムで溶出される画分、50% v/v 酢酸エチル/クロロホルムで溶出される画分を集めた後、得られた溶出液をそれぞれ減圧乾固して黄色油状の物質を得た。次いで、得られた黄色油状の物質を HPLC を用いて分離・精製した。

カラムは P e g a s i l ODS (3  $\mu$ m、カラムサイズ 20  $\phi$  × 250 mm ; センシュー科学社製) を使用し、アセトニトリル・メタノール・水を 55 : 18 : 27 の割合で混合したものを移動層として用いた。流速は 6 mL/min に設定し、246 nm の吸収を指標に、保持時間 120 分の成分を分取した。得られた化合物は  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (第 5 図参照) データ、及び  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (第 6 図参照) データ、マスマスペクトルデータ ( $M+1=917$ ) によってその構造を解析し、下記式 C-13 グリコシルネマデクチン  $\alpha$  (分子式 :  $\text{C}_{50}\text{H}_{76}\text{O}_{15}$ ) であることを確認した。



前記の各実施例において使用した各種培地および緩衝液の組成は以下に示す通りである。

#### ファージ希釈緩衝液 (SM緩衝液)

Tris 塩酸 (pH 7.5)	10 mM
塩化ナトリウム	100 mM
硫酸マグネシウム 7 水和物	10 mM

#### サイクルシーケンス反応停止液

プロモフェノールブルー	0.02 %
EDTA (pH 8.0)	20 mM
ホルムアミド	95 %

#### YEME 培地

酵母エキス (Difco 社製)	3 g
麦芽エキス (Oxoid 社製)	3 g
ペプトン (Difco 社製)	5 g
グルコース	10 g
シヨ糖	300 g
蒸留水	1000 ml

pH 無調整、121℃、1 分間高圧蒸気滅菌。

#### 微量元素溶液

塩化第 2 鉄 6 水和物	200 mg
塩化亜鉛	40 mg
塩化第 2 銅 2 水和物	10 mg
塩化マンガン 4 水和物	10 mg
ホウ酸ナトリウム 10 水和物	10 mg
モリブデン酸アンモニウム 4 水和物	10 mg
蒸留水	1000 ml

## P 1 0 培地

ショ糖	1 0 3 g
硫酸カリウム	0. 2 5 g
塩化マグネシウム 6 水和物	2. 0 3 g
微量元素溶液	2. 0 m l
蒸留水	8 0 0 m l

1 2 1 °C、1 5 分間の高圧蒸気滅菌後、以下の組成のものを無菌的に加える。

0. 5 %リン酸 1 カリウム	1 0 m l
3. 6 8 %塩化カルシウム 2 水和物	1 0 0 m l
0. 2 5 M TES* (pH 7. 2)	1 0 0 m l

\*N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸

## R 2 Y E 寒天培地

ショ糖	1 0 3 g
硫酸カリウム	0. 2 5 g
塩化マグネシウム 6 水和物	1 0. 1 2 g
グルコース	1 0 g
カザミノ酸 (D i f c o 社製)	0. 1 g
寒天	2 2 g
蒸留水	8 0 0 m l

1 2 1 °C、1 5 分間の高圧蒸気滅菌後、以下の組成のものを無菌的に加える。

微量元素溶液	2 m l
0. 5 %リン酸 1 カリウム	1 0 m l
3. 6 8 %塩化カルシウム 2 水和物	8 0 m l
2 0 %L-プロリン	1 5 m l
0. 2 5 M TES (pH 7. 2)	1 0 0 m l
1 0 %酵母エキス (D i f c o 社製)	5 0 m l



1 M 水酸化ナトリウム	5 m l
--------------	-------

## 軟寒天培地

ショ糖	1 0 3 g
塩化マグネシウム 6 水和物	1 0 . 1 2 g
寒天 (D i f c o 社製)	6 . 5 g
蒸留水	8 2 0 m l

1 2 1 °C、1 5 分間の高圧蒸気滅菌後、以下の組成のものを無菌的に加える。

3 . 6 8 % 塩化カルシウム 2 水和物	8 0 m l
0 . 2 5 M T E S * (p H 7 . 2)	1 0 0 m l

## YMS 寒天培地

麦芽エキス (D i f c o 社製)	1 0 g
酵母エキス (D i f c o 社製)	4 g
可溶性澱粉 (D i f c o 社製)	4 g
寒天	2 0 g
蒸留水	1 0 0 0 m l

2 M 水酸化カリウムで p H 7 . 4 とした後、1 2 1 °C、1 5 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌終了後、塩化マグネシウム、硝酸カルシウムを各々 1 0 m M、8 m M と成るように加える。

## L A 培地

トリプトン (O x o i d 社製)	1 0 g
酵母エキス (O x o i d 社製)	5 g
塩化ナトリウム	5 g
寒天	1 5 g
蒸留水	1 0 0 0 m l

2 M 水酸化カリウムで p H 7 . 2 とした後、1 2 1 °C、1 5 分間高圧蒸

気滅菌する。

#### ネマデクチン生産菌種培地

グルコース	10 g
デキストリン	20 g
酵母エキス	5 g
NZ-アミンA	5 g
炭酸カルシウム	1 g
蒸留水	1000 ml

pH無調整、121℃、15分間高圧蒸気滅菌する。

#### ネマデクチン生産培地

グルコース	50 g
綿実粉	25 g
炭酸カルシウム	7 g
蒸留水	1000 ml

pH無調整、121℃、15分間高圧蒸気滅菌する。

#### 産業上の利用分野

以上のごとく本発明は、ネマデクチンを生産するストレプトマイセス属に属する微生物に、ネマデクチン類似化合物を生産する微生物のDNAを導入してC-13ヒドロキシルネマデクチン及びC-13グリコシルネマデクチンを生産蓄積せしめて、採取することができる。このように、分子遺伝学的手法によってC-13グリコシルネマデクチン生産菌を作製することで立体選択的に配糖化されたネマデクチンを効率的に取得することができ、抗昆虫・抗寄生虫等の生物活性の改善が期待される。

## 請求の範囲

1. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する菌株。

2. C-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する菌株がストレプトマイセス・シアネオグリセウム・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus*)  $\Delta n e m A 4::v p h \quad a t t B_{T61}::a v e A 4-a v e A 3-a v e E \quad a t t B_{\phi c31}::a v e R \quad a t t B_{R4}::a v e B I-B V I I I$  (FERM BP-8394) である請求の範囲第1項記載の菌株。

3. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する菌株。

4. C-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する菌株がストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus*)  $\Delta n e m A 4::v p h \quad a t t B_{T61}::a v e A 4-a v e A 3-a v e E \quad a t t B_{\phi c31}::a v e R$  (FERM BP-8395) である請求の範囲第3項記載の菌株。

5. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する微生物を培地で培養し、培養物中にC-13位水酸化ネマデクチンを生産蓄積させ、該培養物よりC-13位水酸化ネマデクチンを採取することを特徴とするC-13位水酸化ネマデクチンの製造法。

6. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・

ノンシアノゲナスに属し、C-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する微生物を培地で培養し、培養物中にC-13位配糖化ネマデクチンを生産蓄積させ、該培養物よりC-13位配糖化ネマデクチンを採取することを特徴とするC-13位配糖化ネマデクチンの製造法。

7. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群を保有するC-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する微生物。

8. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群を保有するC-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する請求の範囲第7項記載の微生物の製造法。

9. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群を保有するC-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する微生物。

10. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群を保有するC-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する請求の範囲第9項記載の微生物の製造法。

11. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ネマデクチンアグリコン生合成遺伝子群nemA3-4オペロンのKS10をコードする領域にバイオマイシン耐性遺伝子を挿入したネマデクチン非生産性の菌株(KS10挿入変位株)。

12. ネマデクチン非生産性の菌株が、ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus*)  $\Delta$  nemA4::vph (FERM BP-8393) である請求の範囲第11項記載の菌株。

13. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、上記KS10挿入変位株にストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群aveA3-4を保有し、NemA1-2及びAVES3-4とのハイブリッドPKSを形成しうる菌株。

14. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、NemA1-2およびAVES3-4とのハイブリッドPKSを形成しうる微生物でストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチン生合成遺伝子群の制御遺伝子aveRを保有する菌株。

15. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、NemA1-2及びAVES3-4とのハイブリッドPKSを形成しうる微生物でストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチン生合成遺伝子群の制御遺伝子aveR及びエバーメクチン配糖化およびオレアンドロース生合成遺伝子群aveBI-BVIIIを保有する菌株。

FIG. 1

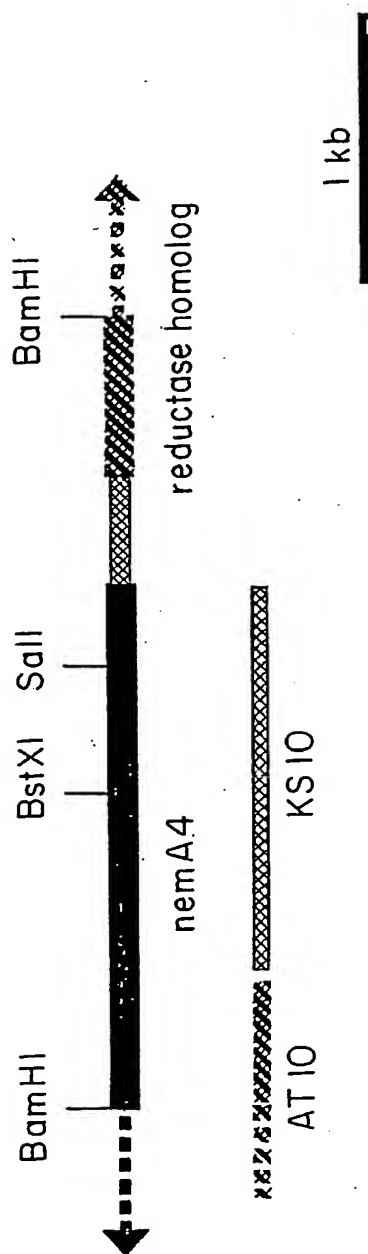


FIG. 2

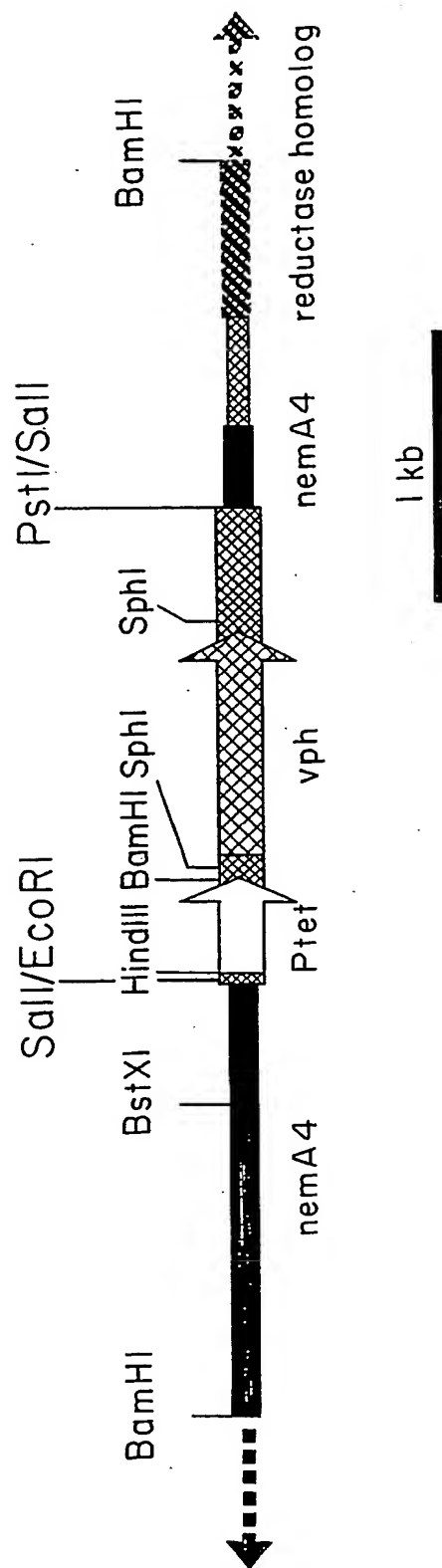


FIG. 3

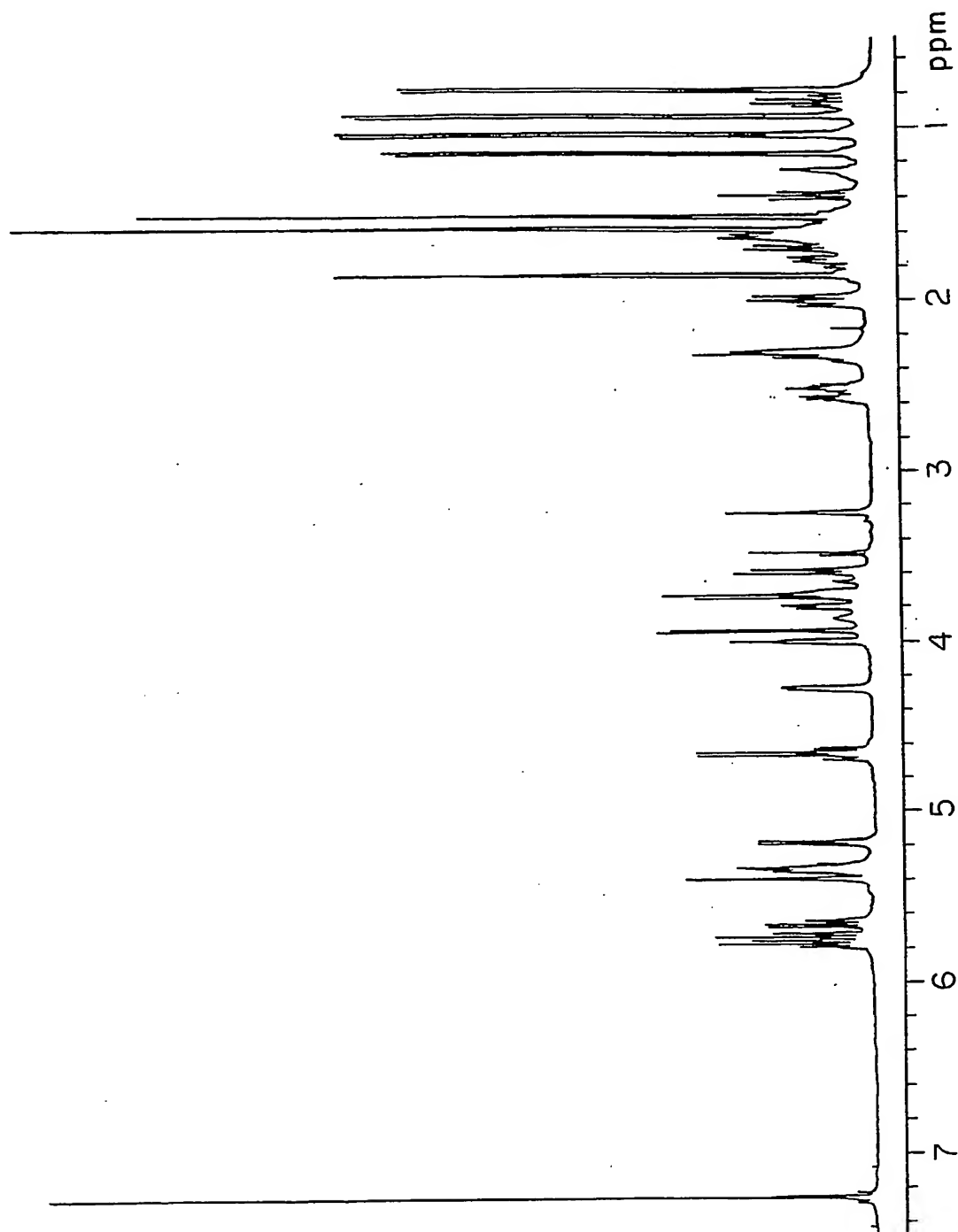




FIG. 4

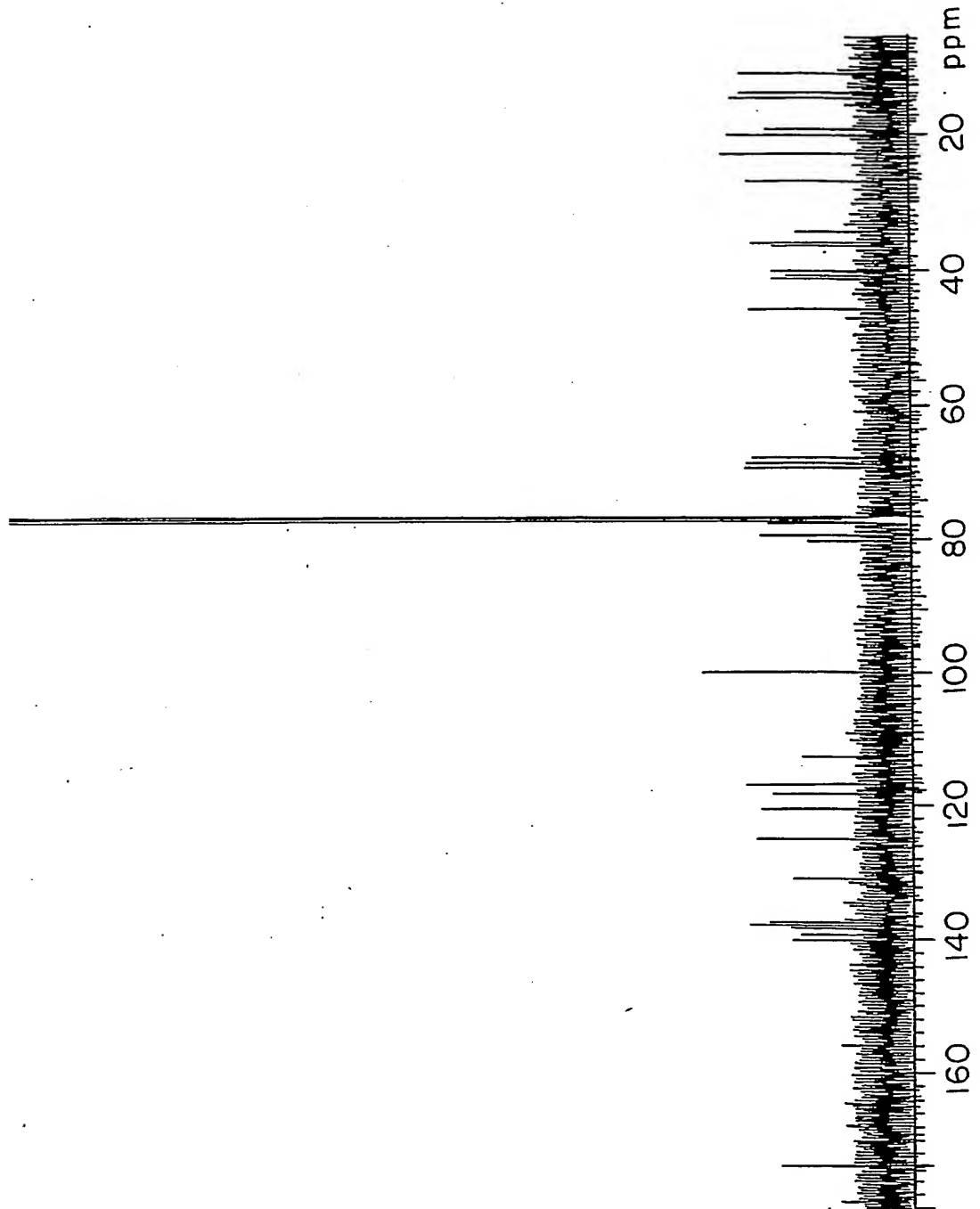


FIG. 5

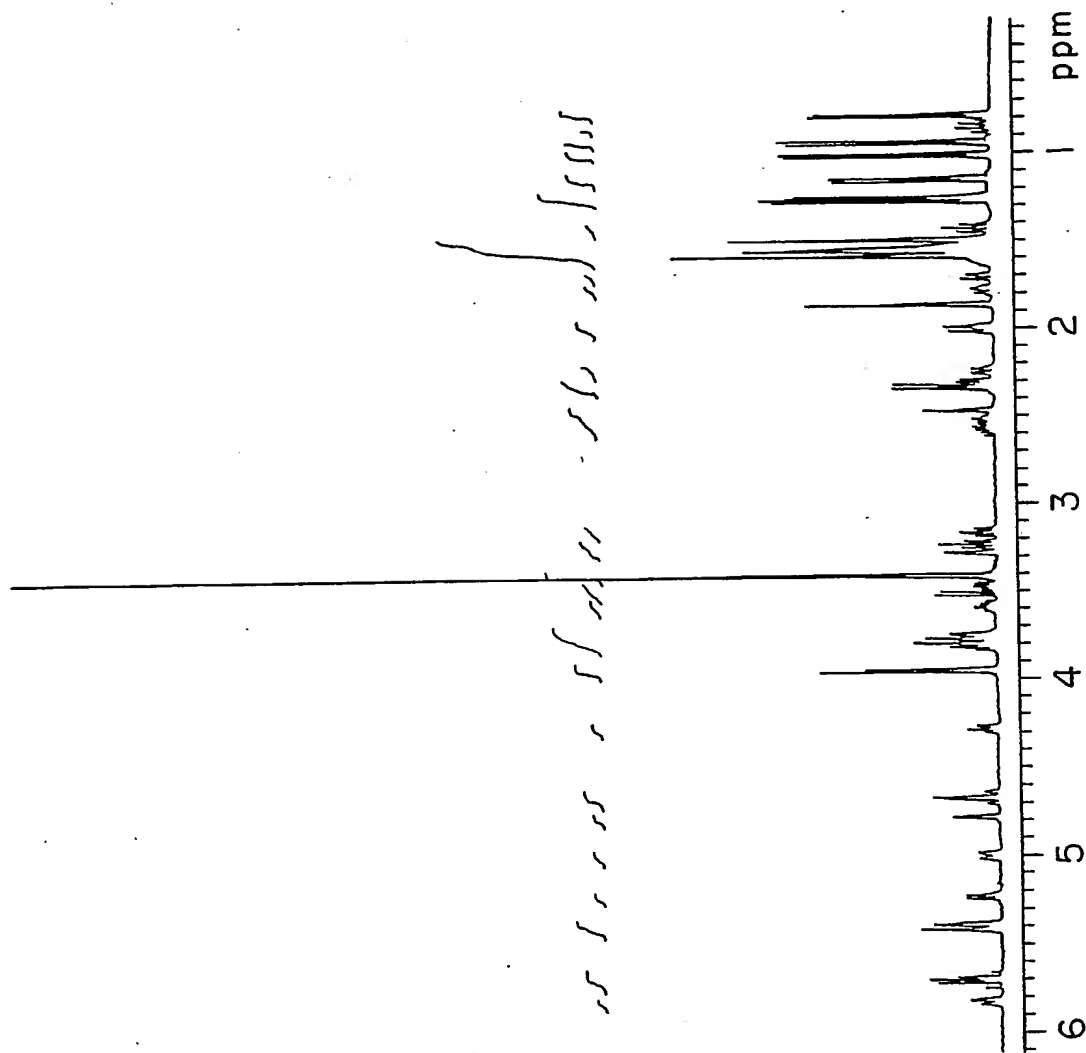
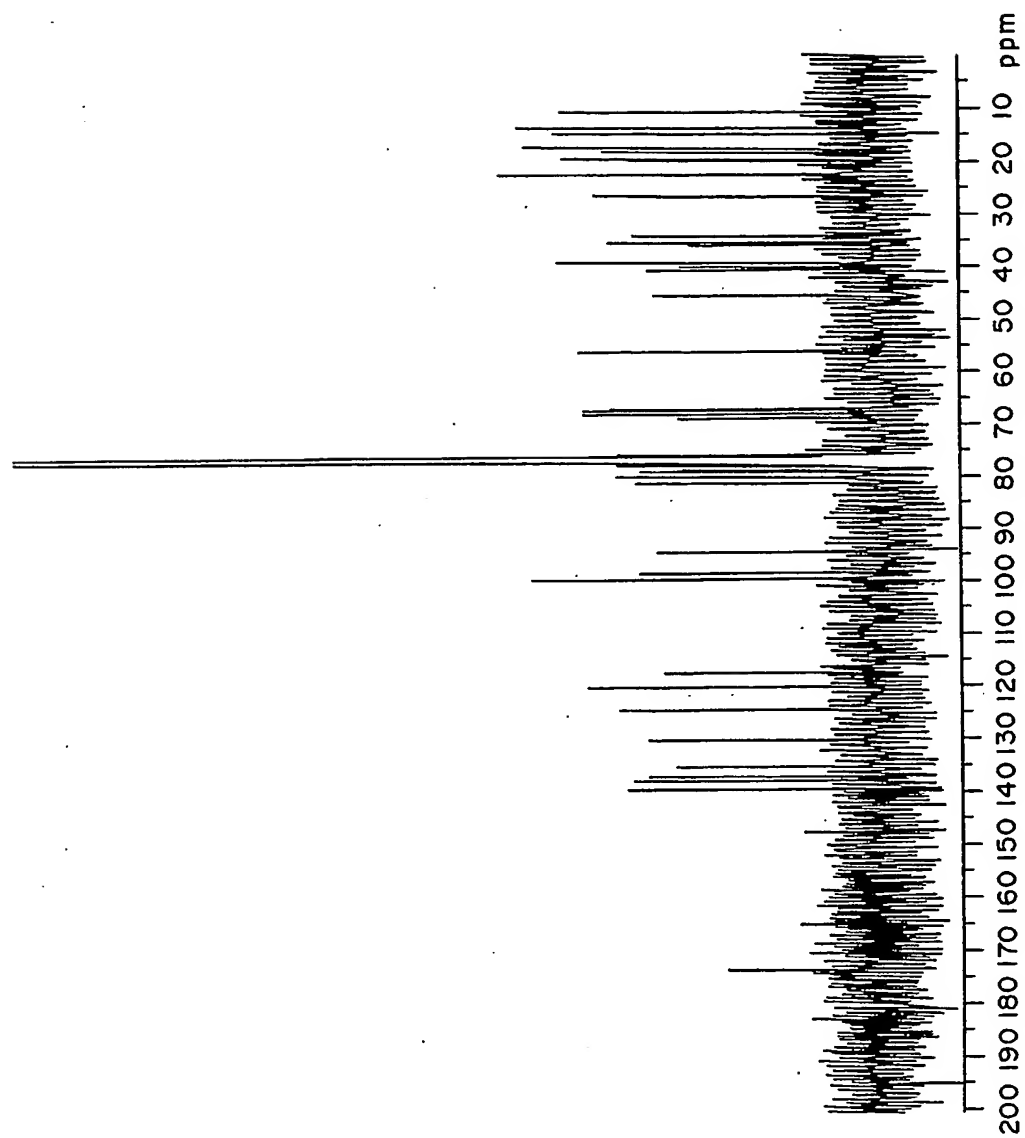


FIG. 6



WO 2004/111230

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> The kitasato Institute

<120> ストレプトマイセス属に属するネマデクチン生産能を有する菌株、該菌株を用いるネマデクチンの製造法

<160> 6

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 1

gtgctgcaag gcgattaagt tgg

23

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 2

tccggctcgt atgttggtg ga

22

<210> 3

<211> 39912

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 3

gaattcttcg gcatcagccc ccgcgaagcc ctcgccatgg acccccagca acgactcctc

60

ctcgaaaccg cctgggaaac catcgaacac gccggcatca acccccacac cctccacggc

120

acccccaccg gagtcttcgc cggaatcaac gctcaagacc acgccgcgca tatccgccaa

180

agccgtgatg tggagaccat cgagggctac gccctgaccg gcagttcggg aagtgtggcg	240
tccggccggg tggcctacac gctcgggctc gaaggcccg cgggtgtcggg ggatacggcg	300
tgttcgtcgt cgttggtggc gttgcattgg ggggagcagg cgttgctgctc ggggtgagtgt	360
tcgatggcgc ttgccggggg tgtgacggtg atgtcgtctc cgggtacgtt tgtggagttc	420
tcacgtcagc ggggtctggc cggggacggg cgggtgcaagg cctattcggc ggtgctgac	480
ggtaccggct gggccgaggg tgtggggatg ctgctgggtg agcggctctc cgacgcccg	540
cgcaacggtc accgtgtcct ggccgtggtg cgtggcaggc cgggtcaacca ggacggtgcg	600
agcaacggtc tgaccgcgcc caacggggcc tcccagcagc gtgtcatccg tcaggccctg	660
gccaatgcgg gactgacccc ggccgatgtc gacgcagggt agggccacgg caccgggacc	720
actctggggg acccgatcga ggcccaggca ctctggccg cctacggaca acaccgccc	780
caccaccgcc ccttgtggtt gggatccctc aaatccaaca tcgggcacgc acaggccgcc	840
gcgggcgtgg gggagtcac caagatggtg atggccctgc gcaacgggct gctgccacag	900
accctccacg tggacgagcc cccccccag gtcgactggt ccacaggcgc agtacaactc	960
ctgacacaac cgggtgccctg gcccgccgac ccggccggcc ggccacgcca cggcggtg	1020
tcacatctcg gcgtcagcgg caccaacgcc cacatcatcc tcgaagaagc accactccc	1080
caggacagcg ataccgacga cgaaccgct gccaacgcac cagccctgcc ccatccctc	1140
cctcttcccg tgccggtgtc ggcgaggctt gaggcgggtg tcggggcgca ggcacaggcg	1200
ttgcgccagt acgtggcagc ccgcccggac atgtcacctg ccgacattgg tgcgggtctg	1260
gcccgcgcc gccgcgtact ggaacacgc gccgtcatcc tggcccgcca ccgcgaggaa	1320
ctggcgagg cactgacagc cctggcagcc ggccaacccc acccccacat caccacaggc	1380
cacaccggg gcggtgaccg cggcgcgctc gtcttcgtct tcccggaca gggcggccag	1440
tgggcgggga tgggcctgac cctgctcacc tcctcaccgg tgttcgcca acacatcgac	1500
gcatgcgaga aagccctcac cccctgggtg ccctggtccc tgaccgacat cctgcaccgc	1560
gaccccgacg accccgcatg gcaacaagcc gacgtggtcc agcccggtgt cttcagcatc	1620
atggtctccc tcgcgcctt gtggcgctcc tacggcatcg aaccgagcg ggtcctcggc	1680
cactcccagg gagaaatcgc cggcgccac atctgcggcg cactcagcct gaaagacgcc	1740
gcaaaaaccg ttgcaactgc cagccgcga ctggccggcg tacgaggccg gggcgccatg	1800
gcctcactgc ccctgcccgc ccaggacgtg cagcagctca tttccgaacg gtgggaaggg	1860
cagttgtggg tggcagccct caacggcccc cactccacca ccgtctccgg cgacaccaag	1920
gcggtggatg aggtgctggc gactgcacc gacaccggcc tacgggcca acgcatcccc	1980
gtcactacg cctcccactg ccccacgtc caacccctcc acgacgaact cctgcacctg	2040
ctgggagaca tcacccccca gccgtccacc gtgccgttct tctccaccgt ggaaggcacc	2100
tggctggaca ccacaaccct ggacgcggcc tactggtacc gcaacctcca ccagcccgtc	2160
cgcttcagcc acgcatcca gaccctgacc gacgacggac accgcgcctt catcgaaatc	2220
agccccacc ccacctcgt ccccgccatc gaagacacca ccgaaaacac caccgaaaac	2280
atcaccgcca ccggcagcct ccgcgcggc gacaacgaca cccaccgctt cctcaccgcc	2340

ctcgcccaca cccacaccac cggcatoggc acaccaccca cctggcacca ccactacacc	2400
caaaccacacc cccaccccaa cccccacacc cacctcgacc tgcccaccta ccccttccaa	2460
caccagcact actggctcca accacccacc acaacaaccg acctcaccac caccggcctc	2520
acccccaccc accacccctt cctcaccgcc acactcaccc tcgccgacaa caacacacaa	2580
ctactcaccg gccgcctctc cctacgcacc caccctgggc tcaccgacca caccgtcgcc	2640
ggcatggtcc tcctgccggg caccgcgctc ctogaactcg ccctccaagc cggcgaacgg	2700
gtggactgcc ctggggtgga ggaactgacc ctgcacgcac cggttggtgat cccgcacacc	2760
gaggacgtga cggtgcaggc caccgttcgg gcagccgatg agagtggcca tcgcgccctc	2820
gcgatccact cgtactccgg caccgcgctc tcggcggacc gggagtggac ccgtcacgcc	2880
acgggcctcc tcacacacca cgcgcacacc gatcacctg ccgacacgca caccgacgcg	2940
tgccctggcg ggagctggcc cccgcccggc gcgcagccca tcgaactggg cgacgtctac	3000
ggtcgtatgg cggcggactc ggacatcgcc tacgggcccgg tcttccaggg gctgcacgcc	3060
gcctggaggc tcggcgacga tgtcctggcc gaggtgcgtc tgccggaaga ggctctgcgc	3120
gatgtccgg cggcggcctt cgggtgtcac ccggccttgc tcgacgcggc cctgcacgcc	3180
acggcgctca cccccagaa cggggacggc tcgacggaga acgtcgccca ggagagcatg	3240
cctgaccgcg cagcccacca ggcgcgactg ccgttcagct ggagcggcgt gtccctgcac	3300
acggcgggca gttccgtgtt gcgcgtacgg ctgtcgcgca gtccgcagca cggtaatgcc	3360
gtggccctca ccgcggccga cgaggacggt cggccggtgg tgacgatcga gtcgctcgcg	3420
ctgcggccgg tgtccaccga ggagctgcgc gcggccgcgg atcgtacgcc cgagcacgag	3480
tcgctcttcc gactggactg ggtttccgta ccagtgcgcg ccaacgcccc ttgcccacc	3540
gcggaccggc cctgggcggt catcggcgcg ggccttcccc acctgcccgg cctgacggag	3600
cacgagcacg tgaccgcgta tgacgagccg gcggacctgc ttctggctct ggaccgcggc	3660
gctccgcgc cgggtgtgct ggtcgttagt ggtgtcgccc acaccgaagc ccgggagtat	3720
tccgccgaag ccccggggga gcgcgggacc gaggcctgcg aggcccgggc ggacgtcgtg	3780
cacgtggcg tcgtgcacac ggctgcctg cacgcggctg ccgcgcagat gttggccagg	3840
ctccaggcct ggctggcgga cgagcgctc gcagacagcc ggctgctcgt cctgacgtgc	3900
ggcgcggtcg cccgcgcctc cggcgacgat gcgacggacc tgcccggggc cgccgtgtgg	3960
gggctggtgc gttcggcgca gtccgagcac ccggaccgca tcacgtgct ggacttcgag	4020
cggggcacag aggcggagcc cggtcagctg gcgacggcgc tgaactgcgg ggagcggcag	4080
cttgccgtcc gccccggagg gctgttcacg ccacggctgg tgccgcgcgc acgtgtcgcc	4140
gacgccgtac ccgccgtacc cgcctgggcc gtaccgtcag cgggtcacgc agccgtaccg	4200
gcagcgggtc ccttccttcc gggcggaacg gtgctgatca ccggcggaac cgggtgctctg	4260
ggccggctcg tggcccgga tctggtggag gcgcacggcg tacggcatct gttgctggcg	4320
ggtcggcgcg gaccggacgc cgagggtgcg ccggagttgc gggcgagct cgggtgggctc	4380
ggcgcgacgg tggaggtcgt cgctgcgac gcggcggacc ggcagcagct ggccgacctg	4440
ctgacacgga tccccgacga tcggccgctg accggtgtcg tgacagtgcc gggcatcctg	4500

gacgacggcg tgatcacgtc gctgtcgccg gagcggtcg gggccgtcct ccgggccaag	4560
gcggacgctg cgctgcttct cgacgagctg acgcgcgggg cagagctgtc ggctttcgtc	4620
atgtttctct ccgcgtcggc ggtggtcggc tcgcccgggc agggcaacta cgccgcggcc	4680
aacgccgtcc tcgaattcct tgctcatcgc cgccgcggcg aggggctgcc cgccgtctct	4740
ctgcctggg gcctgtggga agagggcaca gggatgacgg gccacctcga cgtcgacgac	4800
catgcgcgga tcagccgcgc ggggaatgcgg ccgctgccga ctgccgaggc tctggcgctg	4860
ttcgacgcgg ccttggccga cggcgagccg ttctgatgc cggctcggct cgacctcag	4920
gccgtacggt ctggtgccgc gtccgcaccg gtgcgcggc tgetgcaagg tctgcttcag	4980
ctgcctcggg cccgctcggc cgccgcggcc cccggccatg gggccccggc ggcgacgag	5040
ggggcgccct ggcgtagcgc tctggcccg cagagtgcg gtgagcgag gcaggcgctg	5100
ctgcgcctgg tgcggtcgca tgtcgggcg gtgctcggcc atagcgggtc cgacggaatc	5160
gacgcacgc gggcgcttcg cgagctgggg ttcgactcgc tcacggcggt cgagctgcgc	5220
aaccgtctca cggccgcgac gggcctgcgg ctgcggggca cgtggcctt cgatttcccg	5280
accccgagcg cgttggccga gcacttgggc gagcgtctgc ttcccgacca ggaggccacg	5340
ggcgagcaag ccggcgatca gctctccggc ggcagcgagg aggacgtacg cagcctcctg	5400
acgtccattc cgatcggcag gctgcgggac gcggggctcc tcggggccct gctcacgtc	5460
gcggacacgg gccgcggcgc ctgcggcgcc gccgcaggtc cggaggacgc gccgccctcc	5520
ggccaggaca caccggctcc cgtctcgatc gacgagatgg acatcgacga cctgatggat	5580
ctggcgacg ggcattggac cgacccgcc cgtgagcccg ccgacgcaga ggactcgtcg	5640
tcacacgaa accggacaca ccacacacac gaaggtaga cagcgtgaac ccatccgagc	5700
cgtcggcct gcccaacgaa cgtgtagtag acaccgcacc gtccgatgcc acgtctctac	5760
ccgaggccgg cctgaacagg tcaggagcgc tgccccgtga actgctgtcg ttgccggtgg	5820
tggtgtgggc cggggtcggc ctgctgttcc tggccctgca ggcgtagctg ttcagccgct	5880
ggggcgccga cgggtggctac cggctgatcg agacggcggg ccagggtcag ggccgagca	5940
aggatacggg gactaccgat gtggtctatc ccgtgatttc cgtcgtctgc atcaccgcgg	6000
cggcgcgctg gctcttccgg aggtgccgtg tcgaacgacg gctgctgttc gacgcccttc	6060
ttctcctcgg gctgctgttc gcgagctggc agagcccgt catgaactgg ttccattccg	6120
ttctcgtctc caacgcgagt gtgtggggcg cgggtgggttc ctgggggtccg tatgtgcccg	6180
gctggcaggg ggccggcccg ggtgcggagg cggaaatgcc gctggcgctg gcctccgtct	6240
gcatgtcggc tctgatcgtc accgtgctgt gcagcaaggc actgggggtg atcaaggccc	6300
gccggccggc atggcgagcc tggcggtcgt tctggccgt gttcttcacg gccatcgtgc	6360
tcggctctgt cgagccgctg ccgtccgcct ccgggatcag cgtatgggccc agagcgctgc	6420
ccgaggtgac cttgtggagt ggcgagtggt accagttccc cgtgtatcag gcggtcgggt	6480
ccggcctggt ctgctgcatg ctgggctcgc tgcgttctt ccgcgacgaa cgcgatgagt	6540
cgtgggtgga acggggagcc tggcggttcg cgcaacgggc agcgaactgg gcgcgtttcc	6600
tcgccgtggt cgggtggggtg aatgccgtga tgttcctcta cacctgtttc catatcctcc	6660

tgccctcgt cggtggacag ccgcccagacc aactgccgga ctccttccaa gcgcccggccg	6720
cttactgagt tcagggcagg tcggaggaga cggagaaggg gagggcaccg gagttccggt	6780
cacctcccct ttgtgcatgg gtggacgggg atcacgctcc catggcgggcg ggctcctcca	6840
gacgcaccac actcctcgggt tcagcgatca tgcggagtcg gttggggaag acgtgagtgg	6900
ccttcgtctt gggccgggacc tcgtcgcccg gaagggcgtg tagtcgccag tgggaggcga	6960
cgaccgcgac cgtaacggcc gtctcgagaa gggcgaaagt gtgcgcgatg catttgtagg	7020
tgccgagcgc gaagggcacc cagcccacct tgggaactcc gcggctcgat cccttggttt	7080
cccagcggcc ggggtcgaga cgttcgggtt cggggtagca acgtgggtcg cgctggatgg	7140
cgtaacgcgt gtacatgacc tccacatcgg cgggcaggtc gtgaccgccg agtcgtaccg	7200
gccgcaccgt ccggcgggac cccaccagc cggggtatatt gcgcagtgcc tctttcacga	7260
ggttctgtgt gtacggcagc cgggggaggt cctcgtcgtt gggcaaccgc ccgcccagga	7320
ccgtgtcgag ctctgcgtgc agccgactct cgatctcggc gttctgtccg agctcgtgga	7380
aaatccacgc cgtaatggca gctgggcccgc cgatcccggc caccgcgatt cccatgacct	7440
cgtcatggac ctcttggtcc gtcattggagg caccttcggc gtccgtcgcg cgcagcatcg	7500
tcgagagcag gtcaccgtgg tcgcccgcct cggcgcgata cgccgtgatc gcctcccga	7560
tcgttgcgct cgtaacggcc acggaccgct tgcccgcggt gggaaagaacc tcgtaaaggg	7620
tgggggcgag agcactcagc cgggccacct tcagaatgtc gtgtccggtt ttccgcagcg	7680
ccgcctcggc cttcgcgccc aggtcggaga agaacagcgt ctctgtgatc atggcaagcg	7740
acaggctcgca gggggcctgc tcaacgtcca ccacctgcc agcgtccag gaatcagcg	7800
tctcctgcgc gggggccgcc atggtggcga catagctctc gaggcgctgg cggtggaacc	7860
ctggtcgcgt ccgcctccgc tgcgcgggt gcgtctccc cgatacggct acgaggatgg	7920
ggccgatgaa cggtcgcgc ccctgtgcgc ccttgcctcg ggtgaaatcg cccgatccgg	7980
aggagaccag catggtccgc accagggtccg ggtgcgtggc gaggtaggcg gttttcggcc	8040
cgaggcggag cttgagcagg tctccgtgat ctgctgcgga gcgaaggaaac tccaggggct	8100
gccgcacaa cggcggcaca tggccgacga cggccaggc gccggggcgc tcgggaatgc	8160
tgctcgtcga ctgggacatc acgagtgtc ctttgcgggg tgaagggggg tggtgggag	8220
gggaacgaca gtgacgagtg aagggggagg tgtgggggtt ggcgtcggcc cgggggtgag	8280
cgtggacatg ggagtgggag ggagtgaagt gagctcggag tggtttcttg gttcattga	8340
gattcgaatc cgacttccct gtcgatgaga gcgaacatct cctcgtccga tgtctctgcg	8400
aggtcggggg cgggtgcgtc gccgttcaac ttctgggcga gggaatgcag tcgggaggcc	8460
agccgcgtgc gcgcgccgtc gtccagcggg gcagcggagg atgtggtgga ggagagcact	8520
accgcctcca gccgctcgag ctccgagagc agcaggggca gcccggggg tgctgttg	8580
gcgtccggt cggccgcggc ggtgagtccc ttgctgacga gttgtgtgtg gaggtggtgg	8640
gtgaggggtg tggggttggg gtggtcgaag gcgaggggtg tggggaggcg gagtccggtg	8700
gtgtgggaga gccggttgcg tagttcgacg gcggtgaggg agtcgaagcc gaggtcgcgg	8760
aacgcgcggt cgggggggat ggtgtcgggg gtggtgtggc ccaggacggt ggcgatgtgg	8820



gagcggacca	gggagaggag	ggtggtgtgc	tgtgttcgt	gtgtctggcc	ggccagccgg	8880
ccgtgcagct	gggagccgtt	gtccgcacca	ccggtagtgg	tggtaggggt	ggtgagggcg	8940
cggttgccgg	gcaggaggte	ctgcagcagg	ggcggcaggg	gcggggcggg	acgcaggctg	9000
gcgggcagca	ggaccggccg	gtccagagcc	agggcgcgat	cgaagagggc	cagtgcgtcc	9060
ggggtcgaca	tgggatgcag	accggaacgg	atgatgcgcc	ggtggtcggg	gccggccaga	9120
tgcccggtca	tcccgtggg	ctcttccac	agccccacg	ccagcgacac	ccccggcaga	9180
cccgcgccc	gccgcggta	cgccagcgcg	tccagagcgg	cattggccgc	ggcgtagtgt	9240
ccctgcccgg	ccgaccccag	gatccccg	gccgaggaga	acagcacgaa	cgccgacagc	9300
tccatacccc	gcgtcagctc	atccagcaaa	agagcggcat	ccacctggc	cgcgaaacac	9360
gtgcccagcc	gctcggggct	gagagagggc	atcgtcgcat	cgtccagcac	accagccgca	9420
tgcacgacac	ccgtcagcgg	acacccggca	ggaacaccct	ccagcagccg	gaccacctcc	9480
cgccgctccc	ccacatcaca	cgcaacaatc	cgcacctccg	cccccaacgc	ggccagctcc	9540
gcccgc aaaac	cctccgcacc	cggagcatcc	ggaccacgcc	ggctcaccaa	caacagatcc	9600
cgcacccccc	acacaccagc	cagatgccgc	gccaccgccg	caccacgac	accggtccca	9660
cccgtcacca	acaccgaccc	acccgacaac	cacggcaaca	cctcccgacc	cgatacatca	9720
accggcgact	caagtcgtgt	caggcgtg	gccagcacc	gctcaccacg	caccgccaac	9780
tgcggctcac	cacacgccac	caccgcagcc	acacgccac	catccagacc	agaccccata	9840
ccggcctcgt	tgcgggcac	gcggtcagcg	ccgctgtcga	ggtcgggtgc	caggctcagg	9900
aggacaaacc	ggtccggatg	ctcagcctgc	gccgaccgca	ccagccccca	caccgcccga	9960
cccaccacat	ccaccggggc	atccaccggg	ccgtcctccg	ggccggccac	caccgcaccc	10020
cgggtcacca	ccaccagccg	cgaaccgca	aaccgctcca	gcccagcca	cccctgcacc	10080
acacccaaca	ccccaccaac	aacctcacc	acaccaccgc	caccaccgcc	gccatcggca	10140
ccggcatccg	ggcaccgcaa	caccaccacc	cccggcacac	catcctcctc	agccgccaga	10200
ccaacgaggt	cgtcggcacc	atccagcacc	accaccgatg	ccccgcccga	caccagtaca	10260
tctgagggca	cctcaaccca	cttcatgtcg	aagagctcag	cgcgctgtac	ggcgcgctcg	10320
gcagctcgca	attcgtccgc	cgccaacggg	cgcaccgcca	acgcctcgac	ggacgccacg	10380
ggcgtaccgg	tgtcatccgt	gaccagcacg	gaaactgcgg	cgtggccgct	gttcggatcg	10440
gccggcgaga	gtcgcacg	caacgacgac	gcattggcgg	cgtgcagcgt	cacaccgggtg	10500
aaggagaacg	gtacggatcc	ctgcggcaga	ctgcccga	gcgcaaaggc	cgtgcgtgc	10560
aaggcagcat	ccagcagtgc	cggttgccag	ttgtacgcgg	atgcctcgcc	gtgcacctgt	10620
tctggaaggg	gaacctcggc	aaacacctcg	tctcccagac	gccaggcagc	agtcagcccc	10680
cggaatgcgg	ggccatagac	aaagccattt	gcctcgtagt	cgccatacaa	ggctgccaat	10740
tcctcatcag	cacagcgaac	tgcgcccgt	ggcggccaca	tcgacagatc	atcgtggcta	10800
cggcctgtct	caatgcgcga	ggtcttggtt	cccagaacgg	ccgtggcggtg	atgacgccag	10860
ggagccgctg	cgggggcggt	ctcgcttcgc	gagtagatcg	tcagtgaacg	agtgtcgggtg	10920
tcgtccgggtg	gattgatgtg	cacctgaacg	tcgacggcac	cctcacgggg	gatgacgaga	10980

ggcgtgtgga gggcgagttc ttcgaggtgg tcggtcgtgg ttgcttgag ggcgagttcg 11040  
aggagggcgg ttcctggcac aagagtggta ccgacgacgg tgtggtcggg gagccagggg 11100  
tggtgtcgta gggagaggcg gccggtgagt agttgtgtgt tgttggtggc gagggtagt 11160  
gttgcggtga ggaggggggtg gtgggtgggg gtgagggcgg tggtagtgag gtcggtgtc 11220  
gtgggtgggtg gttggagcca gtagtgctgg tgttggaagg gtaggtggg caggtcaggg 11280  
tggtggtgtg gggggtgggg gtgggtttgg gtgtagtggt ggtgccagggt ggtgggtgtc 11340  
cgaatgccgg tgggtgtgggt gtgggagagg gcggtgagga agcgggtgggt gtcgttgtcg 11400  
ccgcgggcga ggctgccggt cgcggtgatg ttttcggtgg tgttttcggt ggtgtcttcg 11460  
atggcgggga cgaggggtggg gtggggactg atttcgatga aggggcgggtg tccgtcgtcg 11520  
gtcagggtct ggatggcgtg gctgaagcgg acgggctggt ggaggttgcg gtaccagtag 11580  
gcggcgctca gggttgtggt gtaccagacc aggtgcccta cgacggtgga gaagaacggc 11640  
atggtggacg gctggggggt gatgtctccc agcaggtgca ggagttcgtc gtggaggggt 11700  
tggaactggg ggcagtgga ggcgtagtcg acggggatgc gtttgggccc taggccggtg 11760  
tcggcacagt gggtagggag ttcttctact gcggtggtgt cgcggagac ggtggtggag 11820  
tgggggccgt tgagggctgc caccacaac tgccctccc accgttcgga aatgagctgc 11880  
tgcacgtcct gggcgggcag gggcagtgag accatggcgc cccggcctcg tacggcggcc 11940  
agtgcctggc tgcgcagtcg aacggttttg gcggcgctct tcaggctgag tgcgcgcag 12000  
atgtggcgcg cggcgatttc tccctgggag tggccgagga ccgctcggg ttcgatgccg 12060  
taggagcgcc acagggcggc gagggagacc atgatgctga agagcacggg ctggaccacg 12120  
tcggcttggt gccatgcggg gtcgtcgggg tcgcggtgca ggatgtcggg cagggaccag 12180  
ggcaccacag gggtaggggc tttctcgcgt gcgtcgatgt gttcggcgaa cacgggtgag 12240  
gaggtgagca gggtcaggcc catcccggcc cactggcgc cctgtccggg gaagacgaag 12300  
acgacgccgc cgcggtcact gccccgggtg tggcctgtgg tgatgtgggg gtggggttcg 12360  
ccggtgcga gggctgtcag tgcctgcgc agttcctcgc ggtccgcgcc caggatgacg 12420  
gcgcggtgtt ccagtacggc ccggccgcgg gccagaccg caccgatgtc ggcaggtgac 12480  
atgtccgggc gggctgccac gtactggcgc aacgcctgtg cctgcgcccg caaccggcc 12540  
tcagacctcg ccgacaccgg caccggcacc ggcaccggct cagactcagc caccggaagg 12600  
gctggattcg gagcaccac cgacaccca ccaccggcag caccgcccgc cgcgcaggc 12660  
gcctcctcca aaatcacatg ggcgttggtg ccgctgacgc cgaatgatga cacgccggcg 12720  
tggcgtggcc ggccggccgg gtcggcgggc cagggcaccg gttgtgtcag gattgtact 12780  
gcgcctgtgg accagtcgac ctgggggggt ggctcgtcca cgtggaggggt ctgtggcagc 12840  
agcccggtgc gcagggccat caccatcttg atgactcgc ccacgcccgc ggcggcctgt 12900  
gcgtgcccga tgttgattt gagggatccc agccacaagg gcggtggtg gggcggtgt 12960  
tgtccgtagg cggccaggag tgccggggc tcgatcgggt ccccagagt ggtcccggtg 13020  
ccgtggccct cactgcgtc gacatcgcc ggggtcagtc ccgcattggc cagggcctga 13080  
cggatgacac gctgctggga gggccggtt ggccggtca gaccgttgc cgcaccgtcc 13140

tggttgaccg cactgccacg caccacggcc aggcacacggt gaccgttgcg acggggcgctg	13200
gagagccgct ccaccagcag catccccaca ccctcggccc agccgggtacc gtcagcagcc	13260
gccgaatagg ccttgcaaccg cccgtcccg ggcagacccc gctgacgtga gaactccaca	13320
aacgtacccg gagacgacat caccgtcaca cccccggcaa gcgccatcga aactcacc	13380
gcacgcaacg cctgcgcgc ccaatgcaac gccaccaacg acgacgaaca cgccgtatcg	13440
acgggtcacgg cgggaccctc aaggccaaag ctgtaggcca cccggccgggt cgcgacgctg	13500
cctgcgctgc cgttggcgat gaggccttcg aaaccctcgg ggacatggtg gagacgcgcg	13560
gcgtagtcgt ggtacatcac cccggcgaag acaccggtac gggagccacg catcgacagc	13620
ggatcgatac cgcgccgctc gaacgcctcc cagcagctct ccagcaacaa ccgctgctgc	13680
ggatccatcg ccaacgcctc acggcgactg atcccgaa agtccgcac gaactcccc	13740
gcctcataca aaaaccgcc ataccgcgcg tacgacgtcc ccgaccggtc agggtcggaa	13800
tcaaacaacc cctccagatc ccacccccga cggcgcgaa attcaccaat cgcacccca	13860
cccgacgcaa ccagctccca caactcctcc ggcgaacaca cccacccgg aaaacgacac	13920
gccatcccca caatcgcaat cggctcatcc gcggcaacct gatgaagtgc gacctgcgat	13980
ggcgtctcgc cttccgcgc gtcgccatc agctcacgac gtaggtgacg cgcagggtc	14040
gctgcattcg gctggtcgaa gaccagactg gtcggcagtc gcagtcccg tgcctcacc	14100
aggcggttac ggagttccac cgtgtcaag gagtcgaagc ctaggtcgcg gaacgcgag	14160
tcaacgggga tcatctccg cgcgttgtg ccgaggacgg tggcgatgtg ggagcggacc	14220
aggcgagga ggggtgtgtg ctgttgttcg tgtgtctggc cggccagccg ggcagtcagc	14280
tgggcgcgct tgtccgcacc accggtagtg gtggtgcggg tgggtgcggc gcgggtggcg	14340
ggcaggaggt cctgcagcag gggcggcagg ggcggggcg gacgcaggtc ggcgggcagc	14400
aggaccggcc ggtccagagc cagggccgca tcgaagagag ccagtgcgtc cggggtcgac	14460
atgggatgca gaccggaacg gatgatgcgc cgggtggtcg tgccggccag gtgcccgtc	14520
atcccgctgg cctcttccca cagccccac gccagcgaca ccccgggcag acccgccgc	14580
cgcgcgggt acgccagcgc gtccagagcg gcattggccg cggcgtagtt gccctgccc	14640
gccgaccca ggatccccgc ggcgaggag aacagcacga acgccgacag ctccatacc	14700
cgcgtcagct catccagcaa aagagcgga tccaccttg cgcgaacac cgtgcccagc	14760
cgtcggggc tgagagaggc gatcgtcgca tcgtccagca caccagccgc atgcacgaca	14820
cccgtcagcg gacaccggc aggaacaccc tccagcagcc ggaccacctc ccgccgtcc	14880
cccacatcac acgcaacaat ccgcacctc gcccccaacg cggccagctc cgcgcgaaa	14940
ccctccgcac ccggagcatc cggaccacgc cggctacca acaacagatc ccgcaccca	15000
cacacaccag ccagatgccg cgcaccgcc gcaccagca caccgtccc acccgtcacc	15060
aacaccgacc caccgacaa ccacggcaac acctcccgac ccgataatc aaccggcgac	15120
tcaagtctgt tcaggcgtgc ggcagcacc cgtcaccac gcaccgcaa ctgcgggtca	15180
ccacacgcca ccaccgagc cacacgccc ccatccagac cagacccat accggcctcg	15240
ttgccggcat cggcgtcagc gccgtgtcg aggtcggtgt ccaggtcgag gaggacaaac	15300

cgggtccggat gctcagcctg cgccgaccgc accagccccc acaccgccgc acccaccaca 15360  
 tccaccgggc cgtcctccgg gccggccacc accgcacccc gggtcaccac caccagccgc 15420  
 gaaccgcaa accgctccag ccccgccac ccctgcacca caccacaacac cccaccaaca 15480  
 acctaccca caccaccgcc accgccgcca tcggcaccgg catccgggca ccgcaacacc 15540  
 accacccccg gcacaggccc accacogctc tcaccacgt cctcgtgcca cgcccacgcc 15600  
 tgcccacaca cgggcacagg acccacctca gccactgca ccgcatacag cgaacccgc 15660  
 cgccccgccg aaaccgagac agcacgcaac tgacctatat ccacaggccg caactcaaga 15720  
 cgatcgaccg acgccaccgg caccocgggtg tcgtcgtgta tgcgcacgca cacggccgcc 15780  
 cctgtcgctc caagcgctga caggcacgcg cgacaggaga ctgcaccatg cgtacggaac 15840  
 cgcagaccgt tccacacatg gggcacgacg ggcgtccccg gaccgcgcac agaaagcagg 15900  
 ccggtgccct gaagggcagc gtcgagcagg gccgggtgca gaccgtacgc cgcccgctct 15960  
 cccgacactt cttcggaag acgtgcctcg acgaggatgt cgtcgccgta gcgccaggcc 16020  
 gcgcgcaacc cttggaatgc caggccataa gcaaagccgg cgtcggccat ttgatcgtaa 16080  
 gccgtgttca ggtcgacagg cgtagctcca accggaggcc aggggtcccgc aagcagctcg 16140  
 tacgaggcag tgtcatcgtc cttggcaggg ctcagcacac ccgcggcatg acgcgtccac 16200  
 gcactggccg acgcacggc tccaccactg ccgcctcac cgctgagtg gatggtcatc 16260  
 atgcggcgac ccgactcgtc cggcgccgca atggcaacct gaagggtcac gtctccgacc 16320  
 tcaggaatga ccaacggtgt gtggagcgtc agctcgtcca cgtggtcgca acccacactt 16380  
 tctccggcat gaagggccag ttccgcgaag gccgtaccgc gcagcagcac gacaccgcct 16440  
 accgcatggc cggcgagcca gggatgcgtg cgcaacgaga ggcgccccgt cagtaggcag 16500  
 ccgtcccctt cggccagttc caatgtggcg ccgagtaggg ggtgttcggt ggggtcgagt 16560  
 ccggctgctg acacgttgcc ggcaccgggc tgtgtgcttt cgagccagta gtggtggtgt 16620  
 tggaaggggt aggtggggag gtcgaggtgg gtgtgggtgt ggggttggtt gtggtggtgg 16680  
 gtgtagtgggt ggggggtgcca ggtggtggtg gttttggcga ggttggtgag gaggtgggtt 16740  
 tgggggtggt ggtgggggtg ggtgaggggt aggggtggtg tgggggtggt ggggaggttg 16800  
 tgggtgggtga ggggtggtgag ggtgttgtcg ggtccagatt cgatgtaggt ggtgacgccg 16860  
 tgttggtgga ggggttggtt ggtggtggct atgtcgacgg tgttgccggc ttgttggttc 16920  
 cagtagtggg gggtaggag ttggtcgggt ggggtggttg cggtagtagg gggggtgtgg 16980  
 ggtgggtggt aggtgagggt ttgggtgtgc tgggtgagtt ggttgaggat ggggttggtg 17040  
 tggggggagt ggaagcgctg gttggtgggg aggggttttg ttttgatgcc ttgttggttg 17100  
 cagaggggtg tgatgtgttg gacggtgtgg ggggtgccgc tgatgacgag ggaggtgggg 17160  
 gtgttgatgg cggcgatggc gaggtcgttt tcgtgggcgg tgatgtggtg ggtgatgtgg 17220  
 tgggggggtg tgtggagggt ggtcatggtg ccggggggca tggtttgcac gaggggtggcg 17280  
 cgttggtgta tgaggggtgt ggcgtcggtg aggggtgagga tgccggcgag gtgggcggcg 17340  
 gtgatttcgc cgagggagtg tccggcgtag tagtgggggg tgatgtggtg gccgtcggtg 17400  
 aggaggcggt ggagggcgac ctggaaggcg aagaggcggt gctgggcgta cggggtctgc 17460

tggagcagtg	cggccgcttc	ttcgaggggtg	gtgggtgtcct	gggtgttggg	gtcctgggtg	17520
aggaggggga	ggaggggggtg	gtcagaggtgg	gggtcgaggt	gggtgcagat	gtcgttgagt	17580
gcggcgcgga	agacgggggtg	ggtgtggtag	aggccgtggg	ccatgccggg	gcgttgggtg	17640
ccctgtccgg	agcagatgaa	tgcgggtcttt	cctgcggcct	ccccggtccc	ggtcccgcct	17700
ggggcgctgc	tgtggatgac	ggcgggggtgg	ggttcgccctg	cggcgagtg	ctggagtgt	17760
tgcaggaagg	tgtcgcggtc	ggcggcgatg	agggtggcgc	ggtggtcgaa	cacggcgcg	17820
gcgtgggcga	gggtgtatcc	gacgtcggcg	aggtcgaggc	cggggtggtc	ggtgaggtgg	17880
gcgtgcagg	cctgggcctg	ggcgcgagg	gccggctgcg	acttggccga	caccagccac	17940
ggccacaccc	ctggactgcc	ggcagcagcc	tcctcgccac	taccggcatc	ctcgccggcg	18000
ggtgtccccc	cgggaacgtc	gtcggcggggt	gtgtctgacg	ggatgttgtg	ggcgggtgt	18060
tcttcgagga	tgacgtgggc	gttgggtgccg	ctgacgccga	atgatgacac	tcctgcccgc	18120
cgtagccgcc	cctccccgcc	gggccagggc	accgtctccg	tcagcagctg	caccgcaccc	18180
gcggaccagt	ccacatgcgg	cgacgggtca	tccacatgca	acgtccgcgg	cagcagacca	18240
ttccgcagcg	ccatcaccat	cttgatcacc	ccggcgacgc	ccgcggcagc	ctgtgtgtga	18300
ccgacattgg	acttgaccga	gcccagccac	agcggccccct	cgccggcagc	gtcctgcccg	18360
taggtcgcaa	ggagggcctg	ggcctcgatc	gggtcgccca	aagtgggtgcc	ggtgccgtgg	18420
gcctccaccg	catcgacatc	accggccgac	aagccggcgt	tggcgagggc	ctggcggtatg	18480
acacgtgtgt	gggagggccc	gttgggcgcg	gtcagcccgt	tgctcgacac	gtcctggttg	18540
accgcactgc	cacgcaccac	ggccaggaca	cggtgaccgt	tgcgacgggc	gtcggagagc	18600
cgctccacca	gcagcatccc	cacaccctca	ccccagccgg	tcccgtccgc	cgccgccgag	18660
aacgccttgc	aatgcccgtc	cgcgcccaga	ccccgtgcc	gcgaaaactc	cacgaaggca	18720
cccggagacg	acatcacccgt	cacacccccg	gcaagcgcca	tcgagcactc	accgcacgc	18780
aacgcctgac	aggccagatg	taaagccacc	aacgacgagg	aacaagccgt	gtccaccgac	18840
accgcaggac	cctcaaaacc	aaacgtgtac	gagatacgac	cggaggccac	actcccggat	18900
gtgccgggtca	ggacatagcc	ctcggtgtcg	gctgcggcgt	tttcgtgcag	cctgggtcca	18960
taggcctgcg	gaatgaggcc	cgcgaacacg	cctgtctggc	tcccgcgtac	ggtcgtaggg	19020
tcaatacctg	cctgtcccat	ggcctcccat	gaggcctcca	gcagcaatcg	ctgtgcggg	19080
tccatcgcca	gtgcctcagc	cggactgatc	ccgaagaagc	cggcgtcgaa	ctccccgcg	19140
tcgtagagga	aactcccaca	gcgggtgtac	gaggtgcccg	gccgaccggg	ttccggatcg	19200
aacagtgttt	ccaggtccca	cccacgggtcc	gtcggaaaact	cgccgaccgt	gtccctcccc	19260
gatgcgagca	gttcccacag	ctcctcggt	gaggtgacgc	ctccgggata	gcggcacgcc	19320
atgccaatga	tcgcgacggg	ctcgtcctgg	tctgcaggca	cagccgcagc	acggggagct	19380
gggatggagg	cagtgtgtgc	cgagcccaga	agttgtgtgt	ggaggtgggtg	ggtgaggggtg	19440
gtgggggttg	ggtggtcgaa	ggcgaggggtg	gtggggaggc	ggagtccgggt	ggtgcgggag	19500
agccgggttc	gtagttcgac	ggcgggtgagg	gagtcgaagc	cgaggtcgcg	gaacgcgcgg	19560
tcggggggga	tggtgtcggg	ggtggtgtgg	ccgaggacgg	tggcgatgtg	ggagcgggacc	19620

agggcgagga ggggtggtgtg ctgttggttcg tgtgtcttggc cggccagccg ggcattgcagc	19680
tgggcccgtg tgtccgcacc accggtagtgt gtggtgcggg tgggtgcggc gggggtggcg	19740
ggcaggaggt cctgcagcag gggcggcagg ggcggggcgg gacgcaggtc ggcgggcagc	19800
aggaccggcc ggtccagagc caggggccgca tcgaagagag ccagtgcgtc cggggtcgac	19860
atgggatgca gaccggaacg gatgatgcgc cgggtggtcgg tgccggccag gtgcccggtc	19920
atcccgtgtg cctcttccca cagccccac gccagcgaca ccccgccag acccgccgccc	19980
cgccgcccgt acgccagcgc gtccagagcg gcattggccg cggcgtagtt gccctgcccg	20040
gccgacccca ggatccccgc ggcggaggag aacagcacga acgccgacag ctccataccc	20100
cgcgtcagct catccagcaa aagagcggca tccaccttgg ccgcgaacac cgtgcccagc	20160
cgctcggggc tgagagaggc gatcgtcgca tcgtccagca caccagccgc atgcacgaca	20220
cccgtcagcg gacaccggc aggaacaccc tccagcagcc ggaccacctc ccgcccgtcc	20280
cccacatcac acgcaacaat ccgcacctcc gcccccaacg cggccagctc cgcccgcaaa	20340
ccctccgcac ccggagcatc cggaccacgc cggtcacca acagcagatc ccgcacccca	20400
cacacaccag ccagatgccg cgccaccgcc gcaccagca caccgctccc acccgtcacc	20460
aacaccgacc caccgcgaaa ccacggcaac acctcccagc cagcaacatc accggaccgc	20520
tgagcaggta catcaacgga cgactcaagt cgcgtcaggc gtgcggccag caccgctca	20580
ccacgcaccg ccaactgcgg ctccaccac gccaccaccg ccgccacatg cccaccatcc	20640
acgccccaac cagcaccagc accagcacca gcaccggtgt cgaggtcggg gccgggtgtg	20700
gtgtcgggtg cgaggtcgag gaggacaaac cgggtccggat gctcagcctg cgccgaccgc	20760
accagcccc acaccgccgc acccaccaca tccaccgggc cgtcttcttg gccggccacc	20820
accgcacccc ggggtaccac caccagccgc gaaccgcaa accgctccag cccagccac	20880
ccctgcacca caccacac ccaccaaca acctcaccca caccaccgcc accgcccga	20940
ccggcaccgg catccgggca ccgcaacacc accacccccg gcacaggccc accaccgctc	21000
tcaccacagt cctcgtgcca cgcccacgcc tgcccacaca ccggcacagg acccacctca	21060
gcccactgca ccgcatacag cgaacccgc cgccccgcg aaaccgagac agcacgcaac	21120
tgaccatat ccacaggccg caactcaaga cgatcgaccg acgccaccgg cacaccgcgc	21180
tcacccccga ccacgaccga caccgctca cgcccgccgc cccgccctac agcccacaca	21240
cgcaccgcga caccggtcac acccgcccg tgaagcgaca caccaccca cacagccggc	21300
accgcaacac cctccccgaa ccccgcccc tccccaaacc ccgtcccacc cggaagcaac	21360
accgacaacg gctggaccac accatccagc aacgcgggat gcagcccaaa accagccgca	21420
tcaccccacg cctcctccg cagacacacc tcagccagca aatccccccc atcacgccac	21480
accgcacgca gccccgaaaa caccggcccc aaacacaaac cagccccagc caaacgggtca	21540
cggacaccat cgacatccac cgccaccgca ccccgcgggg gccacacccc cgccagacca	21600
tccaccacca caccaccacc agcagcagcc tcaaccagca cccccaggc atgacacgtc	21660
cacacccccc cgagcgcacc acccccacca caagcactcc caccgcgcgc atacacactc	21720
accaaaccgc gcccctcccc atccgcagcc gcaaccccaa cctgcacact cacaccccca	21780

cccacaggaa ccaccagcgg cgcattgcaca gtgagttgct cgattcgggt gcagcccacg	21840
cgttcgccaa cctggaccgc cagctccacg aacgccgacc ccgacagcag gaccgcaccc	21900
cccacctcgt aatcgcccag ccacggatgc gagcgcgaagg acaggcgacc cgtcagtagg	21960
cagccgtccg tgtctgcgag ttggactgtt gccgcgagca gaggggtgtc ggccggctcc	22020
aagccagcag cggcgacgtc acctgctccc gtgggagcgt cgagccagta gtgctggcgt	22080
tgaagggat aagtggggag gtcgaggtgg tggttgtggg ggtgggtgtg gtgggtgggtg	22140
tagtggtggt gccaggtggt ggggtgtgcc atgccggtgg tgtgggtgtg ggcgaggcg	22200
gtgaggaagc ggcgggtgtc gttgtcgccg cggcggaggc tgccgatcgc ggtgacgtct	22260
tcggcgggtgt cttcgggtggt gtcttcgatg gcggggacga ggggtgggtg ggggctgact	22320
tcgacgaaga cgcggtgtcc gtcattccgc agggcctgga cggcatcgtc gaaacggaca	22380
ggctggtgca ggttcgggta ccagtaggcg gcgtccaggg ttgtggtgtc cagccagggtg	22440
ccctccaccg tggagaagaa cggcacgccg gacggctgcg ggctgatgtc ccccagcagc	22500
tccagcaact cctcccgcag gggctgcaca tgggggcagt gcgaggcata gtcgaccggg	22560
atccgcgggg cccgcacccc ggtgccggca cagtacgcca gcacctcgtc caccgcctcg	22620
gcatcccccg agacggcggt ggagcggggg ccgttgaccg ccgccacca caaccgcccc	22680
gcccaccgct caccaatgag ctgctccacc tcctgggcag gcagcggcac tgaggccatg	22740
ccgccccggc cccgcacagc ggccagcgcc cggctgcgca gcgcaacagt cttcgccgcg	22800
tccttcaggc tcagcgcccc acacacatgc gcggccgcga tctcgccctg ggaatggcca	22860
aggaccgcgt cgggttcgat accgtaggaa cgccacagag cagccaaaga caccatgacg	22920
ctgaacagca caggctggac cacatcggcc cgctcccaca ccgcatcccc cgcgtcccg	22980
cgcaggatgt ccaccacaga ccagtccacc cagggcgcca gagcctcctc gcacgcctgc	23040
atccgcgggg cgaacaccgg agaggaggcg agcagacgca caccatccc ggcccactgc	23100
ccacctgtc cgggaaacac gaagacgaca ccgccccggt caccacccgg cgcattgacc	23160
gtggtcaccc gccgatccgg ctcacccgcc gccagcgccc ccaacccttg caccagctcc	23220
tcacgggtccg cggccaggac gaccgcacga tgctccagca cagcccgccc acaggccaga	23280
ccgcaccca catcggaag cgaaacgtcc ggccggactg ccacgtactg acgcaacgcc	23340
tccgcctgcg cccgcaacct agcctcagac cttagccgaca ccggcacagg aaccggcacc	23400
ggcaccggca ccggcaccga ctcagccacc ggcgcagaca cagccactgg agcggccacc	23460
gactcagcca ccgaaatggc aagaccggga gcaccctcca acaccccacc cccggcaaca	23520
cagccccccg ccgcggcgcc ctctccaaa atcacatgcg cattcgtgcc actgaccccg	23580
aacgacgaca ctcccggccg ccgcaaccgc cctgccggt cccccggcca cggcaccgcc	23640
tccgtcagca gccgcaccgc ccccgggac cagtccacct gcggcgacgg ctcatccaca	23700
tgcaacgtcc gcggcaacac cccctccgc aacgccatca ccatcttgat gacccaccc	23760
acacccgcgg cagcctgcgc atggccgatg ttcgacttca ccgatcccag ccacagcggc	23820
ctgttacccg cccgctgccc gtacgtggcg agcaacgcct gcgcctcgat cggatcacc	23880
agcgtcgtgc ccgtcccatg cccctccacc acatccacat ccgccacgga caaccccgcg	23940

ttcgccaacg cctgccggat caccgcctcc tgagccggac cattcggcgc cgtcaaccca	24000
ttcgacgcac cgtcctgatt gaccgcactg ccgcgcagca ccgccagcac ccgatgcccc	24060
agccgcaccg catccgacaa ccgctccacc aacagcatcc cgacgcccctc gcccatgccc	24120
gtgccgtcgg ctccaccgcg gaaggacttg cagcggccgt ccaccgacag tccgcgttg	24180
cgtgagaact cgacgaagag gtgcggggtc gacatcaccg tcacaccgcc ggccagcgcg	24240
agcgtgcact caccgcaccg cagcgactgg cacgccagat gcagcgccac caacgacgac	24300
gaacatgccc tgtccaccga gacggcaggg ccctcgagac cgagcgtgta ggcgacgcgg	24360
cccgcgcga cggcgccgcc gctaccgttg ccgatgtagc cctcgaatcc ctcggggatg	24420
gtaccacggc gggatccgta gtcgtggtac atcaccocgg cgaagacacc cgtacgggag	24480
ccacgcacgc acagcggatc gataccgcgc cgctcgaacg cctcccacga cgtctccagc	24540
aacaaccgct gctgcggatc catcgccaac gcctcacgcg gactgatccc gaagaagtcc	24600
gcacgaact ccccgccctc atacaaaaac ccgccatacc gcgcgtacga cgtccccgac	24660
cggtcagggc ccgaatcaaa caaccctcc agatcccacc cccgaccggc cggaaattca	24720
ccaatcgcat cccacccga cgcaaccagc tcccacaact cctccggcga acacacccca	24780
cccgaaaac gacacgccat ccccaacaat gcaatcggct cgctggacgc ctccatggcg	24840
gctgccagtt gctcattacg tgcccgcagg gtctggttcg ccttcagaga cgccctaagc	24900
gcgtcgacga gcttttcgct ggacgtgtcc atcactgtct cccaaattca agaagtctca	24960
gaaaggcccg tatggccgta agggggaaag cactgatcga tgccggagcc gaccggatac	25020
caccgactgg ccgactggcc gaccggccga cggggctgtg cccgaccgc cgatcagggc	25080
cgcgatcagg accgcgatca gaggcgcgat cagcgccgca ctgatgcgat ttctgtcagc	25140
cattcgtcga catgccgagc agtcgaatcc gcaaactgtt ccagcatcgt gaagtgattc	25200
ccctggatgt ccagaacggt gtgcggaaact cccacggcg gcggcatctg ttctccgtcc	25260
cggccgcgca ggaagagggc ggggtgtgtg atgtccggag gactccagcc ggagaagatg	25320
cggaagtatc cgcccatggc gaccaggcgt gtgtagtcca cgtccacaaa ctgcgtgacg	25380
cggtcgaaga tttcacttgt cagcgccgac gcgacaggtg cgatgccgtc gtccgggaga	25440
taggcgtcca tggtcaccac cgcttcggga cggacgccta gacgtccag atgactcgtc	25500
accgcgtaga cgaaccatcc gcccgcgga tgcccgga gcgcaaaagg cgcgccgtcg	25560
gtgaaccgga cgatcgctc ggccaacatg cgggtcaccg cgccgattcc ggacggcagg	25620
ggttcgccct ccaggaaccc tggcgagga acgtaccaga cgtctcggtg tccgttcagt	25680
cccgccgca aacgtgagta ctggtacacg ctcgacacgg cggcgacggt gggcaggcag	25740
atgagggcgg gccgtgtttc gcccggggc agtgcttcac cttgggcgcg cgcttcaccc	25800
tgggcgagcc ggacgaacgt cggtccggg atgtccgagg ggtccgtgaa ggcgggcccg	25860
aagaaggagg ccgccgagag cagggccatg gactcctcga tgcggcgggt gtcgtgtccg	25920
atccagaaca gggattcgac ggtttcggtg gaggtgccgc ccctggctctg ctgcttctcg	25980
ctccccgtac tgcgtgctg tccggtctcg gactccctg cgctcccgcc cccggctgcc	26040
gcggcggcag ggcgggctc gtccggcgtg cccgcctcgg ccgtcaggcg ggtcgcgagg	26100



tgatcggcga gtgccgcggg gctgggctgg tcgaagatga gcggtgccgg gaggcgaggg 26160  
ccggtgacgg cgttgatccg gttgcggagt tcgacggcgg tcagcgagtc gaagccgagg 26220  
tcgcggaact cgggtgcggc cgggaccaga tcgtccggga gtgcgcgctc cgcggctgtg 26280  
acggcgctgg tgggggtggc gaggacggcg gcggcatggg tccgtacgag ttccaggagg 26340  
agaccggtgc gctgcgcggg gatggtgagt ccggccaggc gctcgcgcag cgtggcgggg 26400  
gtgtcggctc cgatgccgtg gtcggcggac cgcggggccg ggatgaggat cagcccgtgc 26460  
aggatgcgcg gcaggggcgc ggccgtggcc tgtgcgtgga ggggtggccgc gtcgagccgg 26520  
gtggcgagga gcagcccgtc accgaaaggg ccgaggcgat ccgtgtgtc gaggagcgcg 26580  
agtccctgtg cgttgacag ggggagcagg ccgccgcggg ccatgcgcgc gaagtccgtg 26640  
ccggcgaggt tgcgggtcat gccgtcggc tcgccccaaa ggcccaggc gaggcagccg 26700  
cccggcagtg cctgggtgtg gcgggtgctg atcaggggct ccagaaaggc gttcgcgcg 26760  
gtgtagttgc cctgtccggg actgccgaag gaggcgggcg ccgaggagaa gacggtgaag 26820  
gtggtgaggc cggcgtcgcg ggtcaggctc tgcagggtcg cggcgccga cgccttcgcg 26880  
tgcaggacgg cctccatgcg ctccggagtg agcgagggtg ggatgccgtc gtcgaccaca 26940  
ccggccgtgt ggatcacggc ttccaggggg tgcgcgcgg gcacttggtc gaggagcgcg 27000  
gcgacggccg cccgggtccc gatgtgcag gccgcgaccg tggcctcggc gccgagggcg 27060  
gcgagttcgg cgaccaggtc ggcggcgcg tccgcggccg tgccgcggcg ggtggccagc 27120  
agcagggtgc gtaccccgtg ggccgtggcg agatgacggg cgacgagccg gccgaggacg 27180  
ccggtaccgc ccgtgatgag gaccgtggc tccgggtccc agtcggcgtc ggtggtgtc 27240  
ggctgtggct gccggacggg cactcgtgtc atccgcggga tgcggacggc accatttcgc 27300  
agggcgatct gcggttcccc ggccagcagg ggaaggcggt tgcgggaggc gtcggtgtc 27360  
tcggtgtcgg ccagcaggaa ccggtcgggg ttctcgtct gcacggagcg gaccagtccc 27420  
cagacggcgg cgtgtgcgag gtcggacacg ggctcgtcgg gggtcgcggg gaccgagccg 27480  
tgctgagga gggccaggcg gcaggccgc agccgttcgt cggcgaccca ttctggagc 27540  
agggcgagga cgcgggtggt ggcttgcccg gtggcgtcgg cgagggcggg ggagtcggcc 27600  
ggggccgagc cggccggggc ggaatcggtg agggcggaat cggtgagggc ggaatcggtg 27660  
ggggcggatg cccgtccgg ctgcacgag atgacgacca tgcccgtgc cggggcgccg 27720  
gccgccaggg cttctgcgag agccgccggg tccgggtagg cctgccagga ggcgccgttg 27780  
cgctccagga cggcggcgt ccgccgggca ccggggccga ttagggcca gtcggctgtc 27840  
cgtgccggtg tgggtgggag gtgcagcgcc gccattcga tgcggaagag gtggtcgtg 27900  
tagccggtgc gcgcggcctg gagctgctc gcggagacgg gccggaaggc gagggacccc 27960  
gcggagatga cgatgcgtcc cgatgcgtc gtggccagca gtccgaccgc gtcctcgtcc 28020  
gtgcggacgg tgagacggac gtgcagggtg gaggcgccgg aggcggcgac cgtgacgccg 28080  
gtccaggaga acggcagcca gccgtgtcc tcggcgggcg catcgccctc gtggcgcaga 28140  
acgaccgggt gcagtccgc gtccagcagg gccgggtgca gggcgtagcg ggcggcgctc 28200  
gccgcctgtc cctccgtgt ctccggcagg gtgacgacgg cgaacacctc gtccccgcgc 28260

cgccagacct cgcgagcccc ctggaacacc ggcccgatcc ccaggccggc gccggccagc	28320
tgctcgtacc agccgtccag gtccaccggg gctgcgtcgg cgggcggcca cggttcctgt	28380
gtgtgctcct ccgcgggccg ggcggtgccg gtcaggacgc cggtgccgtg gcagggtccac	28440
tcggtgccgg tcgccgccgc ggacgaggac gacagtccgt cgtcttcgcg ggcgtacagg	28500
gcgaagggtgc gccgttcggg ctccctcgggc gtctgggggc cctgggggtgc cccgacggag	28560
agttgcagga tcaccgagcc ctgttcggga aggacgagcg gtgtccgcag ggtgagttcc	28620
tcgacgggtgc cgcagtcgac ctctgcgcct gcgcgcacgg ccagttccag gatggccgtg	28680
ccgggcagca ggacgggtacc gaagatggcg tggtcggcca gccacgggtg tgtgcgcagg	28740
gagagacggc cggngaagag gaggctctgc gactcggcca gtgccaccgc ggaaccgagc	28800
aggggatgcc cggcggtgcc gagccccgt gccgacaggt ccccggggtg gccggccgag	28860
gtgtcgaccc agtagcgggt gtgatcgaag gcgtaggctg gcaggctcag gtggcgggct	28920
cgatcgcggt cgggcagggc ggcggggccag ttgaccgccg ccgctccgtg cgtatgcagc	28980
cgggccaagc cggtgagcag ggtgccgggt tccgggctgt cgggccgtag gagcgggatg	29040
agcagggttct cttgcggggt gccgggtgctg tcgtcggcgg ggtggctgtc ggcgggtggc	29100
tctaggcatt cctcgccag tgccgacagg gtcccgtctg ggcccagttc catgaagggtg	29160
cggactccgt cgggtgtcag gcggctgatc gcgtcgccga agcgacagg ccgcctacc	29220
tgccggaccc agtactcggg gtcgctcagt tctcccgcg ccacgatgtc gccggtgagc	29280
gtcgacacca tgggaatggc tggttcgtg taggtcagcg aggcgcgac ctgctggaac	29340
tcctccagca tcgggtccat cagcgggtgag tgggaaggcat gcccggttcg caggcgcttg	29400
actctccgcc cgcgctcggc gaaccagtcc gccatgttcc ccacctcgtc ctcggcgcg	29460
gagaacacca ccgaggcggg tccgttcacg gccgcgaccg acaccggggc tcccgggccg	29520
tcgagcgctt gtcgcgcctc ggcttcgctc gcccgtagcg cgaccatggc gccgcctggt	29580
gcgagctgct ccatcaggcg ccccggggcc gccaccaggc ggcaggctgc tgccagggga	29640
agcaccgccg cgacgtgggc ggccgcgagc tcgccgatcg agtgcccggc caggaagtcc	29700
gcgcgcacgc cgagacgttc cagggtgccg aagagcgcca cctggacggc gaacagcgcc	29760
ggctgggctg acccgctacg gtccagaaca tccgcggcat ccgcgacatc cgcaagatcc	29820
gcactggcgt ggatcagcgg gcgcaggggc tgggtccagg gaccgtccag ttccgccagt	29880
acctggtcca gcgcgtccgc gtaggcgggg tgagccgcat acagctgacg gccattccc	29940
acgcgttgcg tgccctgtcc ggccgaacagc atggcggtct tccgcgcg gcggcctgag	30000
tggccgccac gggggccgac cgacccttcg atcaggccgt ccgccgaccg gccctcggcc	30060
agcgcgtcga gggcctgaag gaagccgtcg cggtcctcgg ccacgacgac ggcccggtga	30120
tcgaacacgg accgctgtgc cgccagggcg tgcgccacgt cggccggccg ggcacggat	30180
gccctggcag cgaactgccg caaccgtcgc gcctggcccc gcagcgctcg ctcggaactg	30240
gcggagagca gccacgggat gggcaggagg gccggcttgt cggacatggc gtcggcgacg	30300
cactccggtt cagccgactt gtcggacacg gcctcggcga cgactcagc cgacatctcg	30360
gacatggcgt cggcgacgca ctccggttca gccgacatct cggtcacggc gtcagcgacg	30420

cactccgggt cagccgcctc ctcttgccgc tcggtgaggt ccgccgggtcc ggtggcgctcg 30480  
accacgtggg gcgcctcgac cggcgccctgc tcgacgatga cgtgcgcctc agccgggtacc 30540  
ggctcactga tgactgtgcg ctcgaccggc gcctgctcga tgatgacgtg ggcgttggtc 30600  
ccgctgactc cgaacgcgga gacgcccgcg cgcctggggc ggcggttctg ctgccacgggt 30660  
acgggctcgg tgagaagccg gacgcccgcg ctcgaccagt cgatgtgggg ggagggttcg 30720  
tcgatgtgca ggctggctcg caacagttcg tggttcaggg ccatgaccat cttgatcaca 30780  
ccggccacac ccgcggcagc ctgcgcctgc ccgatgttcg acttcaccga ccccaaccac 30840  
accggccgct ccccggaacg accctgcccg tacgtggcga gcaacgcctg cgcctcgatc 30900  
ggatcaccca acgtcgtacc cgtcccgtgc ccctccacca catccacatc cgccacggac 30960  
aaccgccac acgccaacgc ctgccgaatc acccgctgct gcgacggacc attcggcgcc 31020  
gtcaacccat tcgacgcacc gtccctgattc accgcactcc cccgcaccac cgccaaaacc 31080  
cgatgaccac gacgttcagc ctcggacagc cgtccacca acagcacacc cacaccctcg 31140  
gcccagccga ccccatcggc ccccgaccgc tacgccttgc accggccgctc cggcgacaga 31200  
ccccgctgcc gcgagaactc cacaacgcga cccggcgctg acatcacctg cacaccccc 31260  
gccaacgcca gogaacactc ccccgacctc aacgcctgac acgccaagatg cagcgccacc 31320  
aacgacgacg aacacgccgt atccaccgtc accgcgggac cctcgaagcc gaagggtgtag 31380  
gaaagccgcc cggagacgac gctgttgagg acgcccgtga gcgcgtacc ctcgtggtcc 31440  
tggttgccgc ggcgcaggag ctcggcgtag tcctgctgcg agacgccggc gaagacaccg 31500  
gtcgtggacc cgtgcagcgt ggcggggctg atgcccgcgc gtcccaacgc ctcccaggac 31560  
acctccagca tcaaccgctg ctgcggatcc atcgccaacg cctcacgcgg actgatcccg 31620  
aaaaaccccc catcgaactc cgccgcaccc tgcaaaaacc caccacaccg cgtgtaggac 31680  
gtacccgcgc gccccggctc cggatcatag aaagcctcca cgtcccaacc ccggctcgacc 31740  
ggaaactccc ccaccgcac cgcacccgac gcgatcaact ccagaaaatc ctccgccgac 31800  
tccacacccc ccggaaaacg gcacgccatc cccacaatgg caatcggctc gtcgacatcc 31860  
acacgcggtg ccggggcccg aagggcaagg gcaagggcag tgccgggtgt cgggcttccg 31920  
ccgtcagct gctcgtgat gtgtgccgcg agtgccaccg ggcggggatg gtcgaacacc 31980  
agggtcctcg ggaagcgag gcccggtggc gtgttgaggc ggttgctgag ttcgacggcg 32040  
gtgagggagt cgaaacggag gtcgcggaag gcgcgctcgg gcaccaccgc atcggcggtg 32100  
ccgtgtccaa ggacggccgc ggcattgggt aggaccaggt ccagcacggt ctcggcctgt 32160  
gcggcggggt cgagtccggc gaggcagtcg cgcagcatgc cgccgcgcac ggtgtccacc 32220  
gcctccgaca actgaccacc ccaactgccca gagaccccgg aaccccgcgg cgccccctcc 32280  
acatccagcc aaaagcgctc tcgctcgaac gcatacgtc gcagctccac cccgcaacca 32340  
ccagcgaccc cgcgaccaac actcccgaac acaccggacc actcaaccgc caccacacc 32400  
acgaacaact cggccacgga catcaggaag cgtcgaagc cgccttcgcc ccggcgacga 32460  
gatccgacga ccaggctgtc caagtcaccc atctcgtcca gggtttctg cacaccgacc 32520  
gcgacggccg gatgcgggca cgcctcgatg aagacggtgt ggccggcgcg gaccagcgcc 32580

tgtgtcgcgt cccggaagcg gacgacctgg cgcagggtgc ggtaccagta gtcggcgctcg	32640
agttcgggtgc cgtcgatgcg ttccgccggtg acgggtggagt agaagggcac gtcgccgggtc	32700
ctcgcgcgga tggggggcgag gagttcgagc agccgcccct ggatcgccctc gacctgcggg	32760
gagtgcgacg cccagtcgac catgagcctg cggggccggtg cgtcttcgtg tgacagctcc	32820
tccaccaggg cgtcgaccgc ttccggctcc ccggagacca cggccgaacg cgccccgttc	32880
acggcggcgga tgaccagacg gtcgccccat gtcgcaagac gcggctccag cttctcgacc	32940
ggcagaccga ccgatgccat cgccccctgc ccggccagtg cggccagcgc ctggctgcgc	33000
agggcgggtga cccggggcggc gtcgtcgagg gagagtgcac cggcgacgta ggccgctgcg	33060
atctcgccct gcgagtgcc gccaccgcg tccgggtgta caccgtacga gcgccagagc	33120
gcgccagcg agaccatcac cgcgaagagg acgggctgga cgacatcgac gcgttgacga	33180
gggggtgcgt ccggtgcgcc gcgcaggacg tcgaggagag accagtccag gtacggttcg	33240
agggcttggg cgcagtcgga catctgctgg gcgaagaccg gtgaggagcc gaggagtcc	33300
tgcgccatgc cttcccagtg ggtgccctgt cctccgaaca gcatggcgat ctttccgtcg	33360
gccgccggtc cggccacacc ctgtaccacc cccgcggtgg gtgccccctc ggccagtgcg	33420
tcgagtgcgt gcaggaactc gtcgcggtcc tcggccacga ccaccgcacg atgctcgaac	33480
accgaccgct ccgacaccaa agcccggccg accccagccg gactcacccc cacaccatcc	33540
gcacccccac caaccgccac aaccccacgc aaccgacgcg cctgcccccg caacgccaac	33600
tccgaccgcg ccgacaccac ccacggcacc acccccgaac ccgacaccac ccccggaacc	33660
aactcctgca gccggcccg acccccatcc gcgcccccg agcctcctc caaaatcaca	33720
tgcgcatctg tcccactcac cccgaacgca gacacccccg cagcgcgag ccgaccctcc	33780
acccccggcc actccacctc atccgccaac acacgaaccg acccactcga ccaatccacc	33840
tgcgacgacg gctcatccac atgcaacgtc cgcggcaaca cccccgccg caacgccatc	33900
accatcttga tcacaccgc cacaccgcga gcagcctgcg catgcccgat gttcgacttc	33960
accgacccca accacaccgg ccgctcccc gaacgaccct gcccataagt ggcgagcaac	34020
gcctgcgcct cgatcggatc acccaacgtc gtaccctcc cgtgccccctc caccacatcc	34080
acatccgcca cggacaaccc cgcacacgcc aacgcctgcc gaatcaccg ctgctgcgac	34140
ggaccattcg gcgcgtcaa ccattcgac gcaccgtcct gattcaccgc actccccgc	34200
accaccgcca aaaccgatg accacgacgt tcagcctcgg acagccgctc caccaacagc	34260
acaccacac cctcggccca gccgaccca tcggcccccg acccgtagc cttgcaccgg	34320
ccgtccggcg acagaccccg ctgcgcgag aactccaca acgcaccccg cgtcgacatc	34380
accgtcacac cccccgcaa cggcagcgaa cactcccccg acctcaacgc ctgacacgcc	34440
agatgcagcg ccaccaacga cgacgaacac gccgtatcca ccgtcaccgc cggaccctcg	34500
agccccaggg tgtaggcgac gcgtccggat gtgacgctgc tggacaggcc cgtcatggcg	34560
tagccctcga ggtcctcggg ggcccggcgc acgaggtcgg cgtagtcctg actgcacatg	34620
ccggcgaaga caccggtcgt ggaccgcgc aacgtggcgg ggtcgatgcc cgcccgtcc	34680
aacgcctccc aggacacctc cagcatcaac cgctgctgcg gatccatcgc caacgcctca	34740

cgcggaactga tccccgaaaaa ccccgcatcg aactccgccg caccctccag gaaaccgccc	34800
cggcgcgtat acgacgaacc cgcccgcccc ggctccggat catagaaagc ctccacgtcc	34860
caaccccggt cgaccggaaa ctctcccacc gcatcccgac ccgacgcgac cagttcccac	34920
aagtcctccg ccgactccac accccccgga aaacggcacg ccatccccac aatcgcaatc	34980
ggctcgtcaa cgtcgacacg cgacgccggg accggaggag caatgtcacg ctggccgccc	35040
gcgccctcct ccagctgttc cttgaggtat cgggccagcg cggaggaggat ggggtagtcg	35100
aagatcagcg tgggtggcag gaggagcccc gtgacggcgt tgaggcggtt gcgcagttcg	35160
acggcgctca cggagacgaa gcccaggctg cggaaggctc gtcaggggcg tacggcggtg	35220
ggggtgctgt gtccgagcac ggtcgccgcg tacgtacgga ccaggctgag aagcgcacgt	35280
tcctgctcgg cgggtgtccat ggccttgagc cgtgcggaga acgagtcggg ggatgcggtg	35340
ggggtgtcga gtccggtggt ttcccgggcg aggcgtgctt cggggatgtc gctgatgagg	35400
ggcgagagtc gggagccggg gaggaggttg gcggtgaatc ggtcccagtc gatgtcggcg	35460
accgtcacac aggtctcgtc atggtccaac gcctggccca gtgccaccag cgccgtctcc	35520
ggcgtcatcg ccgccagacc ccgacgccgc atctgcccc aaggccccc cgcctcccc	35580
ccaccagccc acggacccca cgccaccgcc aaccccgga ggcctcacc acgccggtgc	35640
cgaacgattg cctccacata cgcgttcgcc gccgcgtaac tcccctgtcc cgccggcccg	35700
aacgtcgccg cagccgacga gaacaccacg aaccccgaaa gatccgcccc ccgctcaac	35760
tcatgcagat tccaggccgc cagcgccttc gccgcagca ccccggtgac acgctcggac	35820
gacaacccct ccaacacccc gtcatccaca actcccgcg catgcaccac cacaccacg	35880
gggcactccg ccggaacggc cgaccgcaac acctccgcca acgcctcacg gtccgcccga	35940
tcacacgcca ccaccgacac ccgcgcgccc aagcccatca agtcggtcgc gaggttcttcg	36000
actccctggg cgctctcccc gcgtcggtc accagcagca ggtgttcggc gccacgcgg	36060
gccatccacc gggcgacgtg cgcacccaac tcgccggtgc ctccggtgac gagtacggtg	36120
ccgcggggcc gccactcccg ctccgcgacg gcctctcca acggcgccc caccaaccgc	36180
cgcacaaacg cccccgaaga ccgcacggca aactactct caccctcc cccacaccc	36240
gccagcacac ctaccaaccc atcgaccacc cgctcatcca cgagctccgg cacatcaacc	36300
agccaccccc agcggtccgg tgctccgcc ccaccacac ggcccagccc ccacaccaca	36360
cccagggccg gccccacac agcatcccg ccccccaccg acacggcccc gcccgtcaca	36420
caccacagcc ggcccccac gccacatca ccagcgcct gcaccaaccc cacagacgcc	36480
actccgcct gcacgacgcc actccccag ccacaaggg agacgacacc gccgacagcc	36540
tcaccatcga ccgcctcacg caggtggccg gccaacactt ccctgctcac acaccccgct	36600
tcacactcca cccgaaccac tcgcgcccc caccgtcca accctccgc caccacatca	36660
accgggcccc cctcgccctc ggacaccacc agccacgcgc ccgacagccc ccctacacca	36720
ccgcccga aa cgggtcgcca cactcccg tagcgccacc cgtccaccac ttcacgctcg	36780
tgccgtaccc gccccattc cccaacgcc gacaccaccg caccagcga cgcctccca	36840
tccaccccaa ggagcgatgc caccaccccc gcatcaccac actcgaccgc ctcccacaac	36900

ggaccacccc acatcccggga aaccccggaa cctcccgcag atccctcctc cactgccage	36960
caaaatcgct cccgctcaaa cgcatacgtc ggcagctcca ccccgcatcc atcaccgacc	37020
tccgcgagcag tcccctcgaa cacaccggcc cactcaacog ccgtcccagc cactgaacaac	37080
tccgccaggg cggatcatgac cgaccgtgcc tccggctggt ccggccgcag ggcggggatg	37140
gcgcggggccg gtgcactgag cgagtcctgt gcgagggccg acagcgtgcc gtcggggccg	37200
atttcgaggg aggtggtgac gccctgttcc tgaagccatg agatgccgtc cgcgaaacgg	37260
accgtgctgc gggcgtgttc gaccagtag tccgggtgc acatggtctc ggcggggagg	37320
ggcgcgccgg tgacgttga gacgacggga atccgcgggg cgctgaaggt gacctgctcg	37380
gccgcgcggc ggaagtgcgc caacatggcg tccatgtgcg gcgagtggaa ggcgtggctg	37440
gtccgcagcc gccgggtgcg gcggcctcgt gccgccatt gctgcgcgag gtccaggacc	37500
gcgtcctcgt ccccgagag gacgatcgac cgcggccgt tcaccgcggc gtgcgcgacc	37560
cgggatgcgt attcgtcggg cagcgggagg atctcgtcct cggacgcctc gatggccacc	37620
atggctccgc cggacgggag cccttgcatc aggcggcctc gtgcgaccac cagtgcacc	37680
gcgtcggcaa ggcagagcat cccggcgaca tggcgggccg ccagttcacc gacggaatgg	37740
ccgaggacgt agtcggggtg cagaccccag gtctccagca gccggaacag cgcacctcg	37800
aaggcgaaca ggcggggctg ggcgaaaccc gtgtcctcga tcagccggcc ttcgggagag	37860
tcctcggggtg cgaagagtac gtcccgcagc ccaggggcac cgggggtcggg ggcggcggtg	37920
tcggcctccg cgcagatctc gtcgatggc tgggcgaaga cgggggtacgc ctctgacagt	37980
tcgcggccca tgcctgcgcg ctgggttccc tggcggcga agagtacggc gagttcggcc	38040
gaggtggttc gtccctcgac gacgccgggc acggggcggc cgcgggccag tgcgtcaggt	38100
gcgtgcagga actcgtcgcg gtcctcggcc acgaccaccg cactgatgctc gaacaccgac	38160
cgctccgaca ccaaagcccc cccgacccca gcggactca cccccacacc atccgcaccc	38220
ccaccaaccg ccacaacccc acgcaaccga cgcgcctgcc cccgcaacgc caactccgac	38280
cgcgcgcgaca ccaccacgg caccaccccc gaaccgcgaca ccacccccgg acccaactcc	38340
tgcagccggc ccgcaccccc acccgcgccc cccgacgcct cctccaaaat cacatgcgca	38400
ttcgtcccac tcaccccgaa cgcagacacc cccgcacgcc gcagccgacc ctccaccccc	38460
ggccactcca cctcatccgc caacacacga accgaccac tcgaccaatc cacctgcgac	38520
gacggctcat ccacatgcaa cgtccgcggc aacacccccg cccgcaacgc catcaccatc	38580
ttgatcacac ccgccacacc cgcagcagcc tgcgcagtgc cgatgttcga cttcaccgac	38640
cccaaccaca cggcgtgtc accggcccg cgcgcgtacg tggcgagcaa cgcctgcgcc	38700
tcgatcggat caccagcgt cgtgcccgtc ccgtgccct ccaccacatc cacatccgcc	38760
acagacaacc ccgcacacgc caacgcctgc cgaatcacc gctgctgcga cggaccatc	38820
ggcgccgtca accattcga cgcaccgtcc tgattcaccg cactcccccg caccaccgcc	38880
aaaacccgat gaccacgacg ttcagcctcg gacagccgct ccagcagcaa aatccccacg	38940
ccctcggaca tgcgggtgcc gtcggcagcc gacgcgtacg ccttgacccg gccgtccggc	39000
gacagacccc gctgcgcgga gaactccacg aacatgcccg ggggtggacat gaccgtcacg	39060

cctccggcga gggcgaagga ggactcaccg gtgcgcagtg actggcaggc gaggtgcagt	39120
gccaccagcg acgacgagca cgccgtgtcg accgtcaccg cggggccctc gaagccgaag	39180
gtgtaggcga cgcgtccgga caggatgctt cccgcgttgc cgttgcccag gtagccggcc	39240
aggtcgtcgg ggaccgagag cagacgggtc gcgtagtcct gggacatgag gccggcgaag	39300
acgcccgtcc ggctgcgcg caacgtggcg gggtcgatgc ccgcccgtc caacgcctcc	39360
caggacacct ccagcatcaa ccgctgctgc ggatccatcg ccaacgcctc acgaggactg	39420
atccccaaaa accccgcctc gaactccgcc gcaccctcca ggaaaccgcc ccggcgcgta	39480
tacgacgaac ccgcccgcgc cggctccgga tcatagaaag cctccacgtc ccaaccccg	39540
tcgaccggaa actccccac cgcctccga cccgacgcaa tcaactcca gaaatcctcc	39600
gccgactcca cccccccgg aaaacggcac gccatccca caattgcaat cggctcctgc	39660
tcgcccgtt caatctgtg aagtcgacgc cgcacattga ggagatcggc agtaacgcgc	39720
ttgagatagt cgcggagctt ttctcgtta gccatggacc ggtctcctcg acaagagaaa	39780
tcggaaatta aaaaacacgc atgggactct cacaggctag agcgacgaga gcagcacaaa	39840
taccctaga taccacagac ccctgatgct cgatgaatgc cgtatagct aggggggtatg	39900
gcgcagaca tg	39912

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Streptomyces avermitilis

&lt;400&gt; 4

ccatggaccg gtctcctcga caagagaaat cggaaattaa aaaacacgca tgggactctc	60
---	----

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 3274

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Streptomyces avermitilis

&lt;400&gt; 5

accggtcacc cggattcca ttccgtgttg cagcacgcga ccaactgcgc atccccactcg	60
tgaattgtgg accgccatcc ggggcacgga tgtctccagg aaggaaactcc ttcaccctcg	120
cgaacaccac ctcaaatcc cagcatcctc agttaatcat caaagtcagc gaccttgaca	180
ctaccccgc caccagggca aattcataac actgaccatc acctctgatg ctgatcaacc	240
cagcccgcac ggccgcgacc gcttttgctc aagcaatcga aatccccgag acacgctttc	300
ttggaaaaag gagaaataag aacatcatgc agggagtttc ctgtctgcac cccctcgga	360

aaccagaaga actcacgctc gtcgaccggg aaacacagtt ccgcgcgctg cgggtggccc	420
ttaccgaatg cggggccggc acggtgaaac tgctcgtcgc cgaggcgga atgggctgtg	480
gaaagagtac gttcctgggc gaggcactgc acaccgccgc cgcctccggc ttcgccgtcc	540
tgctgcccgc cgggcttccc gcggaccacc ggcaaccctt cggcgtactg cagcaactgc	600
tgaacgaccc cgcctccgag gacaccgccc gcaccgccgt ccgccccatg ccggtgcaac	660
acgtccgagg cgcctcga cgcctcggc ccggcgcccc gctggcgatc ggcacgacg	720
acgtacagga cgggacccg gagtcgctgc actgtctgat gcgcctcacc cgcactccc	780
ccacctcgcg gatcctgctg ctgtgcaccg ccttggcggtg cagtcgggccc gccgaccggg	840
tactcgaagc cgagctgatg cgtcagaccg ccttcgaacg catcacgctg gactgcctgt	900
ccctggacgg agtgaccggg ctggtctcgg accgtcggc gcggcccccacg gcgccccgc	960
cggcgacta ctgcctgacc gtcaccgggg gcaaccgct gctgctgcgg gccctgctcg	1020
aagagcacag cgaggccgac gccccctcgg caccgccccc ggcgaggccc tccgcgctgc	1080
actccccgcc gcaggcgccc ccgcccgcgc cggtcgtcgg cgcccgcttc taccagtccg	1140
tactggcctg cctgtccgc acggagacgg cgatcaggca gacggccggc gccctcggcg	1200
tcctcggcgg gcgtgcgcgc gccgacctgc tccccaaact gtcggcgcg agtcccgcgt	1260
cggtcacccg ggggtcggt gcgctggagg cgacggggct gaccacctcc ggccgtttcc	1320
ggcaccgggt ggccgaggcc gccgcgctcg acgactgga cccgagccgc cgtgccacc	1380
tgcaccgccg agcggcgggc ctgcagcacc acgacggcgc ggcgccggcg gacgtcgccc	1440
gccaccttct cgcggcccgc catgcggcgg gccctgggc ggtgtccgtg ctgcgtgacg	1500
ccgccgagca gtcgtggcg caggacgacg tggcgctcggc ggtctcctgc ctggaactcg	1560
cctacggggc ctgtgtccgg gaacgggaac gtccggagat caggatcagg ctgcgcccg	1620
ctttcggggc caccaacatc gcggtggcgg aagagcacct cgcgacctg gtcgccacct	1680
tgcggaagg agaattgacc ggccatcaga cggtttact cgtccctctg ctctcaacc	1740
acggccgctt cggcgaagcg cgggaggcga tggaccggct caacgcgcgc gacgacgcgc	1800
gcggcctgtg cgcggacggc ggcttcccga tggcgctcc gtggcgctcg accgcacacc	1860
tcgccgacg ccgcatccc gccgcgcgc gcgatcccg caccgcgcgc gatcccgcg	1920
acaagccgtt cctgccccgg cagtccggtg cccgcagcc ccggccggag gacggccgtg	1980
gccagcagcc gacagcggcc ttgtggggcc tgcgcgaaa cggcaccagc gaggcgccg	2040
cacacgccgc ggaacaggta ctgcggtcct cccgcgtcac cgacagcacc ctctgtctcc	2100
tggatgaacgc cgtgcggatc ctgcgccgca cgggcgggta cgacaccgcg gacatctggt	2160
gccaccgctt gctcggcgag gccaccgct gccgttgtcc cggctggcag gcgcacctcc	2220
tggcggtgcg ggccgaactc tcgctgtgcc gtggcctgct cgcgacgcc aaggagtgcg	2280
cccagcgcg actgacacac gtaccggggc acagccgag cgtcttcgcg ggcggtccgc	2340
tggcctgcca ggtcctcgcc tgcaccgga tgggacgcta cgacgaagcc acgcaactgc	2400
tcagccatcc ggttcccgag gcgctgttcc acagtgtgta cggcctgggg tacctgcggg	2460
cccggggcca ttccacctg gccatgaacc gcctgcccgc cgcgctccgc gacttctca	2520



ccgccggccg ggtggcgccg gagtggggac tggaccatcc ggtgctgctg ccctggcgta	2580
cggacgccgc ggaggcggtc ctccggctcg gggaaacgaa gagggccgac caactcctca	2640
ccgaacagct cgtctccccg cacagcggca acccgtacgt ccgcggcacc gcgctgcgcc	2700
tgccggccca gaccgcggcg ccggcggaac ggctccggct gctgagcgag gcggtcagtg	2760
acctccagag ctccggcgac cgcctggcgc tggcccgcg actggccgat ctccggcgccg	2820
cgtatcacag ccggaacgag cccgtacggg cgagcgccac ggtccgccgc gcctggcagc	2880
tggccaagga gtgcggagcc caggccctgt gcgacagcat cctgccaggt cgcggcacca	2940
aggaccgggg gcccgacgga agggcgggcg cgaccgaggc cctgctgagc gagtccgaga	3000
tgcgagtcgc gacactggcg gcggggcgga acaccaaccg tgagatcgcc ggccggctct	3060
gcgtcacctg cagcacggtc gaacagcatc tgacgcgggt ctaccgcaaa ctgaacatca	3120
cccgccgcag ggagctgccg acccgtctgc gacacctgc ggaccaggcc aactgaccac	3180
gggagggggg gcgtcccggc cgacgtgtgc tcgtcttcg cctcacgaca tggcgggcg	3240
gatgcacagc cccccactcg catccaccaa ctga	3274

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 11041

&lt;212&gt; DNA

<213> *Streptomyces avermitilis*

&lt;400&gt; 6

ctgcagccgg ccgcacccc caccgcggcc ccccgacgc tcctccaaaa tcacatgcgc	60
attcgtccca ctaccccga acgcagacac ccccgacgc cgcagccgac cctccacccc	120
cggccactcc acctcatccg ccaacacacg aaccgaccca ctcgaccaat ccacctgcga	180
cgacggctca tccacatgca acgtccggcg caacaccccc gcccgcaacg ccatcaccat	240
cttgatcaca cccgccacac ccgcagcagc ctgcgcatgc ccgatgttcg acttcaccga	300
ccccaacccac accggcggtgt caccggcccg ctgcccgtac gtggcgagca acgcctgcgc	360
ctcgatcgga tcaccagcg tcgtgcccgt cccgtgcccc tccaccacat ccacatccgc	420
cacagacaac cccgcacacg ccaacgcctg ccgaatcacc cgctgctgcg acggaccatt	480
cggcgccgtc aaccattcg acgcaccgtc ctgattcacc gcaactcccc gcaccaccgc	540
caaaacccga tgaccacgac gttcagcctc ggacagccgc tccagcagca aaatccccac	600
gccctcggac atgccgggtgc cgtcggcagc cgacgcgtac gccttgacc ggccgtccgg	660
cgacagaccc cgctgccgcg agaactccac gaacatgccc ggggtggaca tgaccgtcac	720
gcctccggcg agggcgaaag aggactcacc ggtgcgcagt gactggcagg cgagggtcag	780
tgccaccagc gacgacgagc acgccgtgtc gaccgtcacc gcggggccct cgaagccgaa	840
ggtgtaggcg acgcgtccgg acaggatgct tcccgcttg ccgttgccca ggtagccggc	900
caggctcgtcg gggaccgaga gcagacgggt cgcgtagtcc tgggacatga ggccggcgaa	960

gacgcccgtc cggtgcccgc gcaacgtggc ggggtcgatg cccgcccgt ccaacgcctc 1020  
 ccaggacacc tccagcatca accgctgctg cggatccatc gccaacgcct caccgggact 1080  
 gatccccaaa aaccccgcat cgaactccgc cgcaccctcc aggaaaccgc cccggcgcgt 1140  
 atacgacgaa cccgcccgc cgggtccgg atcatagaaa gcctccacgt cccaaccccg 1200  
 gtcgaccgga aactccccca ccgcatcccg acccgacgca atcaactccc agaaatcctc 1260  
 cgccgactcc acaccccccg gaaaacggca cgccatcccc acaattgcaa tcggtcctg 1320  
 ctgcccgat tcaatctgct gaagtcgacg ccgcacattg aggagatcgg cagtaacgcg 1380  
 cttgagatag tcgcgagct tttcctcgtt agccatggac cggctcctc gacaagagaa 1440  
 atcggaatt aaaaaacacg catgggactc tcacaggcta gagcgacgag agcagcacia 1500  
 ataccctag ataccccaga cccctgatgc tcgatgaatg ccgctatagc taggggggat 1560  
 ggccccagac atgaattcac agcgtttcgg cggccggctg gcgcttgta caggtgcagg 1620  
 cgggtggcatc gggcgggcga ccgctgcgc tctcgatcg gccggggcgc gagggtgtg 1680  
 cgtggaccgg gacggccgcg gcgcgggggt gacggccgac ctggcccga cgcggggcgc 1740  
 gcgggcggcc tggcccgagg tggccgacgt gtccgacgga gcggcgatgg agcggttcgc 1800  
 cgagcgcgtc gccgagacgt acgggggtcgt ggacctgctg gtgaacaacg ccggcatcgg 1860  
 catggcgggg cgttttctcg acacgtccgt cgaggactgg cagcgcaccc tgggcgtcaa 1920  
 cctctgggggt gtcattcatg gttgcgcct catcgccgg cagatggcgg agcgcgggca 1980  
 gggcgggcac atcgtgacgg tggcgtcggc ggcggcggtc cagccgacgc gggcgggtccc 2040  
 cgcgtatgcc accagcaagg cggcggtgct gatgctgagc gaggcctgc gcgcggagtt 2100  
 cgcggagttc ggggtcggag tgagcgtggt gtgccgggc ttcgtccgta cgtcgttcgc 2160  
 gtcggcgatg catttcgcgc gtgtgcccc gctggagcag gagcggctgc gggcgtgtt 2220  
 cgccggctgc ggtatgcagc cggagaagggt ggcccgggcg gtactgcggt cgggtggcgcg 2280  
 cgactcggcc gtggtgaccg tgacggcgga agcgcggctg tcacggctga tgagccgctt 2340  
 caccacacgc ctgcgcgcgc cgggtggcgc gatggatccc ccttcgtagg gctggcgggg 2400  
 atccccctct tgccttcgaa catcttcga cgatgggcag tgagagatgt cagatcattt 2460  
 tctcttcag agtgccgcgt tctgggggca tgtgttcccc agtctcgcgc tggcggagga 2520  
 gctcgtgcac cggggccacc acgtcacctt tgtgacgggc gcggaaatgg ccgatgcggt 2580  
 gcgttcctg ggcgtgatt tcctgcggta cgagtccgcc ttcgagggtg tcgacatgta 2640  
 ccggctgatg accgaggccg agccgaacgc catcccatg acgctgtacg acgagggcat 2700  
 gtccatgttg cgttcggtgg agggacacgt cggcaaggac gttccggacc tgggtggcta 2760  
 cgacatcgcc acctccctca acgtgggtcg tgtcctcgcc gcctcctgga gcaggccggc 2820  
 catgacggtc attcccctgt tcgcgtccaa cgggcgcttc tccacgatgc agtcggtatt 2880  
 ggatccggat tccgtcagg tcagtgcgcc gccgcgcgc ttctcggagc agatggagtt 2940  
 gttcggcctc ggggcgctgg tgccgcgcct cgcggagctg ctcgtttccc ggggtatcac 3000  
 ggaaccggtc gacgatttcc tttccggacc ggaggacttc aacctggtgt gtctgccgcg 3060  
 cgcttccag tacgcgggcg acaccttcga cgagcgggtc gccttcgctg gaccatgtct 3120

gggtaagcgc aggggtctgg gcgagtggac accaccgggc agcggggcatc cagtgggtgct	3180
catctccctc gggaccgtgt tcaaccggca gctgtccttc ttccgcacgt tcgtccgggc	3240
gttcaccgac gtccccgtgc acgtcgtgat ctogctcggc aaggggggtcg accccgatgt	3300
gctgcggccg ctgccgccga atgtcgaggt gcaccgggtg gtgcgcacc atgcgggtgct	3360
ggagcatgcc agggctctgg tcacgcacgg cggtagccggc agtgtgatgg aggcactgca	3420
cgcagggtgc cgggtgctcg tcatgccctt gtcgcggggac gcgcagggtga ccggccggcg	3480
gatcgccgag ctggggctgg gtcgtatggt gcagccggag gaggtcacgg cgacgacgct	3540
gcgcgggcac gtgctggaca tcatctccga tgacgcgac acccgacagg tcaggcagat	3600
gcagcggggc acggtcgagg cgggcgggcg cctgcgggca gcggacgaga ccgagcggtt	3660
tctgcgccgg acgcgccgtc actgaccggc agctcggggc gggcgggtgag tggctccac	3720
agggttcggg tctccacgta ccaactgaac gtctgtgcca gccctcctc gaagggcacg	3780
cggggcgcggt aaccgagctc ggcggagatc ttgtgatgt ccagcgagta gcgcgggtcg	3840
tgcccttgc ggtcgggtcac gggttcgacc atcgaccagt ccacgccgag cagggtccagg	3900
agccgggccc tgagctcacg gttggacagc tccgtcccgc ctccgatgtg gtagatctcg	3960
ccgggcctgc cgcgttcggc gaccagggcg atgccacggc agtggtcgtc cacgtgcagc	4020
cagtgcgga cgttttcgcc gtcgccgtac aagggcacct tcgtgccgtt cagcagatgg	4080
gtgacgaacc gcgggatgag tttctccggg aactggtggg ggccgtagtt gttcgagcat	4140
cgggtgatga tcaactgtag gccgtgcgtg cgggtgaagg accgggcgag cagggtcggag	4200
gacgccttgg acgcggagta gggcgagttc gggtccagcg gggcgctcctc ggtccacgag	4260
ccggagtcga tggagccgta gacctcgtcc gtcgagatgt acacgaagcg gtccacggcg	4320
gcgtcgggtg cggcgccgag cagggtgtga gtgcgagga cattggtgag tacgaactcg	4380
gcggcgctcg ccacggaccg gtccacgtgt gactccgccg cgaagtggac caccatgtcg	4440
gagccgtcca tcagggtccg gaccaagggc ccgtcgcaga tgtcgccgtg cacgaagatc	4500
agggatgggc ttcccaggac cgggtgcgagg ttctccaggc gaccgcgta ggtcagcttg	4560
tcgagcacca cgacctcggc accggtgaac gccggatacg cggccgtcag caaccgccgt	4620
acgaaatggg aaccgatgaa accggcgccg ccgctcacga gtaggcgcat cccgggctcc	4680
tcaccgggc ttccgcccga atactcatca gatactcgcc gtagccggag ccggccagtt	4740
cgaccccgcg cagatagcag tcgtccgcgt cgatcagacc catccggaag gcgctctcct	4800
cgagacaggc gatccgtact ccctggcgct tctccaggac ctgcacatac tgccggcggt	4860
gcatcagcga gtcgtgcgtc ccgcacatga gccagggtgaa gcccgggccc aggtccacca	4920
gccggggccc cccctcggcg aggtaggccc tggtgacgtc ggtgatctcc agctcgccgc	4980
gggcccacga gcggatgccc cgggcccact cgatcacgtc gttgtcgtac aggtacaggc	5040
ctgtgatcgc cagggtggac cggggggcgg tgggtttctc ctgcacggac agcagctttc	5100
cggaggcgct gacctctccg actccgtacc gtccgggac cgtaaccgcg tatccgaaca	5160
acacacagcc gtcgacatcg cgggtgtggc tgccgagcag gtgcgaaaag cccatgccat	5220
ggaagatgtt gtccccaagg acaagggaca cctgatcctg accgatgaaa tcggcgccga	5280

tgaggaatgc ctcggcgatt cctcccggtc gctgctgcgc ggcgtagtcg atgttcagcc 5340  
cgaggcggtt tccgtctccg agcagtctcc ggaattgttc gagatgatcg ggtgaggaaa 5400  
tcaccaggat gtcttttatg ccgccgagca tcaacacgga gagcgggtag tagatcatgg 5460  
gtttgtcgta gacagggagc agctgcttgg aaagggcacg ggtcaacggg taaagccgag 5520  
agccggttcc ccccgcgagc acgattccct tcatgtcggc ctccccgcag tcgacgttat 5580  
atatctctgc cgtctgcccc acggtaccaa gtggcggaac acgcaccagg aattcgagcg 5640  
ccgctagggg gaagggctca agaagatagg ggccaccaga tggggcggtt ttcgggtgtgc 5700  
ccgccccggc cgaccggaat actgaagagc atgctgacga ctgggatgtg cgaccgaccg 5760  
ctggctcgtc tactcggagc ctccggctat atcgggtcgg ccgtcggggc ggaactcgcc 5820  
cgggtggcgg tcctgttgcg gctgggtggc cggcgaccgg gcgtcgttcc gccggggggc 5880  
gcccgcgaga ccgagacgag tacggccgac ctgacggcgg cgagcgagggt cgcctcgcc 5940  
gtgacggagc ccgacgtggt gatccacctg gtgcgcgcgc tcaccacagg agcggcatgg 6000  
cgggcggcgg agagcgatcc ggtggccgag cgggtgaacg tcgggggtgat gcacgacgtc 6060  
gtcgcggccc tgcgggtccg ggcgcgcgc gccgcgcgc cgggtgggtgt gttcgccggg 6120  
tcgggtctacc aggtgggccc ccgggtcgg gtgcgacgga gtgagccgga cgagcccgtg 6180  
acggcctatg cccgtcagaa actcgacgcc gaacggacgt tgaagtccgc cacggtcgag 6240  
ggtgtcctgc gggggatctc gctgcggctg cccaccgtct acggcgcggg gccggggccc 6300  
cagggaacg gcgtcgtgca ggcgatggtg ctccggggcg tcgccgacga ggccctcacc 6360  
gtgtggaacg gaagcgtggt ggagcgtgac ctggtgcatg tggaggatgt cgcgcaggcc 6420  
ttcgtgagct gcctggcgca cgcggatgag ctgcggggc ggactggtg gtcggcgagc 6480  
ggtcgtcctg tgaccgtccc gcacctcttc ggtgccatcg ccgcccgggt gtccgcccgc 6540  
accggcgccc ccgcggtgcc cgtgaccgag gtggaccctc cggcgatggc gacggcgggc 6600  
gacttccacg ggaccgtcgt cgactcctcg gcgttcggcg cggtcaccgg gtggcgggcg 6660  
cggctgtcgc ttcaggaggg cctggaccac atggtggcgg cttacgtgta gcgccggggt 6720  
ggcgccgggg ccggggcggt gacggcccg atccgggtcg gccgtcacag cttctcgtcg 6780  
aggccgcggc tcgcgcggta ctccggcaac atgccgcgtc gcagggcctg ctggagagtc 6840  
ggcgcgcgcc ggtcgcgctc ggagaggatc ggtgcccgcc cgaggtggtg gccgaggggc 6900  
agggcgaggc ccggtatctc gggcgagagg gcgtgttcgt tctgcggaac gtagccgctc 6960  
gacatcaggc acaccatcgc cgtgtcgtct tccagcgcca cgaacgcgtg cccgaccccc 7020  
atcggcaggc agacggaacg gaagcgctcc tggtcgagga ggaccgagtc cactgcccg 7080  
aaagtcggtg agccggtgag caggctcgag acgaagtcca gggcccgctc ccggggcgag 7140  
tgacgtact tggcctggcc ggggtggtgc gcgggtgaagt gcacgccgag gacgacggc 7200  
cggcgcgaga cgctctggca ggtctgcgag gtgggaaacc ggtgcccgac ggccctcgctg 7260  
aggaccggtt cctggtaggg ggtgacgaag agcccgcgct cgtcggggaa gaccgtcggg 7320  
gtgaattcga cggcgccctc gacgacgagc ctccggaccg tgacaccggc ggcggtggcc 7380  
cgggcgcccg cggcgggggc gggccggtcg gcggagctcc ggcgaggccg gccaaagggtc 7440

atcgtgtcac tctctctgtc gtgcgggttg tcatacgggt agtcgtacgg gccggttccg	7500
gagtcacagc tcgacggcgc ggggtggtgag cagggacagc aggggtgcggg cctgcacgtt	7560
cacgtaacgg ccgtaccgca gcagctgggt cagctggccc ggggtgcacc agcggtaacc	7620
cggggcgggg tcgttcggcg cctggctctc gtcggcctcg acgaacaggt agcgcgcctg	7680
tgcgtgcaga aagcgaccgc cctcctccga gtggaccgcc gcgtagcggg tgcggtcggg	7740
cgcgccctcc agcaccaggt cgaggaagcg cggcctggcc ggtcccgtga ggtgggagta	7800
gttgccgggg gtgtactgga ccgtcgggcc gatttcgatc gtgtcgagga agccgccctc	7860
gacctgcccg tgggcgagca ggtgcggtac gccgccgatc cggcgggtca ggaaggcggg	7920
gatgccgtgg ccgcacgggt cgatcagggg ctgggtccag gcggcgacct cccggttggg	7980
ggcctcgaca cggaccgcga ccacacggaa gtaccgggtc gcgtgggtgg cgatggactc	8040
cgcgcccgtg gtccagccgg ggtatgccgg caggggcacg cggcgggctg gcacggagtg	8100
ccgggagcgt tcggcggcgt accaggagag cagtccggcg tcgctgtgca gggccgcggg	8160
ctcgtcgaac ggggtgggaa ggcaggcgag gacctgctg gcgtccatgt tcaccaggtt	8220
gtcccgggtc atcagttcgc cgatctgccc cagtgtcagc cagcggaaagt cgtcgtccag	8280
tggtagctcc tcgtcgggtc ccaccaagat gttgcggttg aacttccggg ggaaccaggc	8340
tccgtgctcg gactggagga cgtcgaccac cacggtggcg cggcggggct gtgtgaagta	8400
ctcgaggtac ttacaggcgg cggcccgctg gaccttgggt tagttgtctg gcgtggcctg	8460
cacggtgggc gacagctgga ccaggttgat gttgccgggc tccatcttgg cctgcacag	8520
gaagtgcagg accccgtcga acttcttggc gaggatgccg aggatgccga tctcgggctg	8580
gtggatgatg ggctgtgcc attccgggaa gggctgttca ccgcctcgga cgtgcagtcc	8640
ctccacggag aagaaccggc cgctgcggtg ggcagattg ccggttccgg ggtgaaacga	8700
ccaggcgtcc atcccgtgga aggggatgcg ctcgaccggg aaccgggtgg ccccggaaccg	8760
ccgcgtccac cagccggtga acgcgtcgag ggacgtccgg cggcgggtgc gccacggcg	8820
gcggagcggg cgaggcacgc gggcagggcg gcgtcgtgcc gcgcgggtgag cgggtgctggg	8880
ctcgggtgtg tcggcatcgg ctcgtagct catgcacccc acgtcatgta gatcacgggt	8940
ggctcgcggc cgggcagttg gcgcagtggt gcgtggctga ggcggaacgc ctcgtcagc	9000
gcccgtgtct ccccgggcca ttgggggtg gtgagttcgt cgaaggcgag gatgctgcc	9060
ctggtcaggt gcggtgtgat gacgtccagc agttcgcgcg tggggcggtg gaggtccagg	9120
tcgaagtagg ccagcgcgat gacggtgtgc ggggtgttccg ccagggtattg gggcacgggt	9180
tcgcgtacgt cgccctggac cacgaaggaa cgctgggtgt ggccgtaggg ttcgttcgcc	9240
tcgtgcggc cgagcacctg ccgcaggtgc tccacttcgc cgtccggcac ggcgaaccgc	9300
ccagggaccg cgctgggtgt gacctcgtcc gcctcgtcga tgtcggggaa gccggtgaac	9360
gtgtcgaagc cgatgacgcg gcgcagcgag ttgtacggct catagatgct gcgcagcgcg	9420
gtcagcgtgg cgagggtgcc tccgtgcaga acgccgaact ccatgatgac gccggggact	9480
tccggcagca tgcggtacag cgcgtccatg gagagcaggt cggcgagctg gttgcgcgcg	9540
atgtagacgg acagggtgtc gatcaggtac ttccggcgga tcgggctgtc gacgaggagc	9600

ttggtcagct gctcgcgggc agcgcggtcc tgctcggact cgtgcggcac gatccgggga	9660
tcggtgaact cccgctcggg catggaggcc ttctctttca tgggtcggta ccgggcgcgc	9720
cggacgtgcc ggtcgtaccg ggcgtgccgg cgggcacgac gctgtcgggt caggacagcc	9780
aggcgtcggg ggcggatccg ccgcgccga ccggggggaa cagctcctcc aggcgggcca	9840
ggacgggctc gggcagcggg gtgcgcaggg cgtgcagtgc cccgtccacg tgetgttcgg	9900
tgcgcgggcc gatgaccagc ccggtcacgc cgggcccga cagcaccag gccatgccga	9960
catgggcggg gtcgaggccg tgggtccgc acacgtcctc gtacgcgcg atggtggtgc	10020
ggtggtgctc cagggcctcg acggcccggc cctgtgccga cttgaccgc gtgttctccc	10080
gcgtcttgcg caggacaccg ccgagcaggc cgcggtgcag tggcgaccag accaggacgc	10140
cgacaccgta ggcggacgcg gcggggatga ctccagctc ggcggtgcg gtcacgaggt	10200
tgtagacgca ctgctcggag gcgaggccca gggcggtgcg ccgcccggcc gcctcctggg	10260
cggaaagcgt gtcccagccc gcgaagtgg aggagccgac gtacgcgacc ttgccctgcg	10320
tgatgagcag gtccatcgcc tgccacacct cgtcccagcc ggcgcggcg tcgatgtggt	10380
gcagctggtc caggtcgatc cagtcggtgc gcagtcggcg cagcgaggcg tcgcaggcg	10440
ccacgatatt gcgtacggac agtccgtgat cgttggggcc gctgcccac ggatcgccga	10500
ccttggtggc cagcaccacc tgetcacgc gggcgggcg gtccgccagc cacctgccga	10560
tgacctcttc ggtgtacccc ttgtggacgc gccagccgta ggtgttggcg gtgtcgaaca	10620
gggtgatgcc ctgagccagg gcgtgatcca tcagtcggcg cgttcgggc tcctccacc	10680
gtccgcgat gttgaccgtt ccgagcgcca gtcggctgat cctcagccgg gtcctgccca	10740
gttcggtgtg gaggggagca ctgctgttgc tgtcggactg gacgggtgcg ggctcggcg	10800
tcgtaggcat catcgatcag tcgacaactc ctcgtgcgtg agcggcgggc gctcgagcag	10860
gaccctgacc tgaggcccag gaggtaccg gcgatcatgc gatacaggca gccgctcgat	10920
ggtgggacac gggctgccgt cgcggggcat aggggctgat gggggttgc cgggtcggg	10980
ccggtgaca gcttcgtgga caccaagttg atccagttga tccactccga aaggcagagg	11040
c	11041

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/07407

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 1/21, C12P17/18// (C12N1/21, C12R1:465)  
(C12P17/18, C12R1:465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, 1/21, C12P17/00-17/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), CA/REGISTRY (STN), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	WO 93/18779 A1 (MERCK & CO., INC.), 30 September, 1993 (30.09.93), & US 5312753 A & EP 637244 A1	<u>1, 3</u> 2, 4-15
<u>X</u> Y	NAKAGAWA, K. et al., MICROBIAL CONVERSION OF MILBEMYCINS: HYDROXYLATION OF MILBEMYCIN A <sub>4</sub> AND RELATED COMPOUNDS BY Cunninghamella echinulata ATCC 9244. J.Antibiot., 1991, Vol.44, No.2, pages 232 to 240	<u>1, 3</u> 1-15
Y	CARTER G.T. et al., LL-F28249 ANTIBIOTIC COMPLEX: A NEW FAMILY OF ANTIPARASITIC MACROCYCLIC LACTONES. ISOLATION, CHARACTERIZATION AND STRUCTURES OF LL-F28249 $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\lambda$ . J.Antibiot., 1988, vol.41, No.4, pages 519 to 529	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
04 July, 2003 (04.07.03)

Date of mailing of the international search report  
22 July, 2003 (22.07.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07407

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Haruo IKEDA et al., "Combinatorial Biosynthesis -Polyketide Kgo butsu o Rei to shite-", Protein, Nucleic acid and Enzyme, Vol.43, No.9, (1998), pages 1265 to 1277	1-15
Y	Haruo IKEDA et al., "Metabolic Engineering no Tenkai-1 Biseibutsu 2ji Taisha Sanbutsu Seigosei no Kinoteki Kakuhen ni yoru Yuyo Bushitsu no Sangyo", Kagaku to Seibutsu, Vol.34, No.11, (1996), pages 761 to 771	1-15
Y	Haruo IKEDA et al., "Series Taisha Kogaku/Seigosei Kogaku (4) Seigosei (2) Hosenkin Polyketude Segosei Idenshi no Kaiseki to sono Oyo", Bioscience & industry, Vol.59, No.8, (2001), pages 530 to 533	1-15
Y	JP 2003-33188 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 04 February, 2003 (04.02.03), (Family: none)	1-15
Y	MACNEIL D.J. et al., A Comparison of the Genes Encoding the Polyketide Synthases for Avermectin, Erythromycin, and Nemadectin. Ind.Microorg.(Edited by BALTZ R.H. et al.), 1993, pages 245 to 256	1-15
A	SHIH T.L. et al., SYNTHESIS OF AN AVERMECTIN-NEMADECTIN HYBRID. Tetrahedron Lett., 1991, Vo.32, No.30, pages 3663 to 3666	1-15



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/09, 1/21, C12P 17/18 //(C12N 1/21, C12R 1:465) (C12P 17/18, C12R 1:465)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/00-15/90, 1/21, C12P 17/00-17/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), CA/REGISTRY (STN), JSTPlus (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	WO 93/18779 A1 (MERCK & CO., INC.) 1993.09.30 & US 5312753 A & EP 637244 A1	<u>1,3</u> 2, 4-15
<u>X</u> Y	NAKAGAWA K. et al. MICROBIAL CONVERSION OF MILBEMYCINS: HYDROXYLATION OF MILBEMYCIN A <sub>4</sub> AND RELATED COMPOUNDS BY <i>Cunninghamella</i> <i>echinulata</i> ATCC 9244. J. Antibiot. 1991, Vol. 44, No. 2, p. 232-240	<u>1,3</u> 1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.07.03

国際調査報告の発送日 22.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JIP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三原 健治



4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	CARTER G.T. et al. LL-F28249 ANTIBIOTIC COMPLEX: A NEW FAMILY OF ANTIPARASITIC MACROCYCLIC LACTONES. ISOLATION, CHARACTERIZATION AND STRUCTURES OF LL-F28249 $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\lambda$ . J. Antibiot. 1988, Vol. 41, No. 4, p. 519-529	1-15
Y	池田 治生 他, コンビナトリアル・バイオシンセシス ーポリケチド化合物を例としてー 蛋白質 核酸 酵素, Vol. 43, No. 9(1998)p. 1265-1277	1-15
Y	池田 治生 他, メタボリックエンジニアリングの展開-1 微生物 2 次代謝産物生合成の機能的改変による有用物質の生産 化学と生物, Vol. 34, No. 11(1996)p. 761-771	1-15
Y	池田 治生 他, シリーズ 代謝工学/生合成工学④ 生合成② 放線菌ポリケチド生合成遺伝子の解析とその応用 バイオサイエンスとインダストリー, Vol. 59, No. 8(2001)p. 530-533	1-15
Y	JP 2003-33188 A (協和醗酵工業株式会社) 2003. 02. 04 (ファミリーなし)	1-15
Y	MACNEIL D. J. et al. A. Comparison of the Genes Encoding the Polyketide Synthases for Avermectin, Erythromycin, and Nemadectin. Ind. Microorg. (Edited by BALTZ R. H. et al.) 1993, p. 245-256	1-15
A	SHIH T. L. et al. SYNTHESIS OF AN AVERMECTIN-NEMADECTIN HYBRID. Tetrahedron Lett. 1991, Vol. 32, No. 30, p. 3663-3666	1-15